CHARAKTERISIERUNG DER ZELLBINDUNG VON SERRATIA MARCESCENS AN PARTIKULÄRES DEXTRAN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

MARIA LUISA PORTALES

aus Puebla (Mexiko)

Bochum 1981

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549228_0003

CHARAKTERISIERUNG DER ZELLBINDUNG VON SERRATIA MARCESCENS AN PARTIKULÄRES DEXTRAN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

MARIA LUISA PORTALES

aus Puebla (Mexiko)

Bochum 1981

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD).

UNIV. LEIDEN BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 8. März 1982

para Jörg

DANKSAGUNG

Die Durchführung dieser Dissertation wurde durch die freundliche Unterstützung folgender Personen, Firmen und Institutionen ermöglicht:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Winkler für die Überlassung des Themas und seine stets hilfsbereite und aktive Betreuung der Arbeit.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Jörg Meyer für die sprachlichen Korrekturen und die Entwicklung der Fotografien.

Ferner danke ich -

Dem DAAD für die Gewährung eines Stipendiums zur Finanzierung meines Aufenthaltes in Deutschland.

Frau Güttges für ihre Hilfe bei der Isolierung und Charakterisierung der Isomaltooligosaccharide.

Herrn Prof. Dr. Hauser für seine Ratschläge für die Elektronenmikroskopie sowie für die Untersuchung eines Präparates.

Herrn Prof. Dr. Wackernagel für seine Hilfe bei der Durchführung eines Experimentes und seine Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Dr. Rosenkranz für seine Hinweise zur Messung von Fimbrien.

Den Firmen Schrobenhausen und Maizena für die kostenlose Überlassung ihrer Produkte.

ABKÜRZUNGEN

A. dest.	Destilliertes Wasser
Ara	L-Arabinose
CFA	Colonization Factor Antigen
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPEC	enteropathogene E. coli-Stämme
EU	Enzym Unit (Enzymeinheit)
Fr	Fraktion
Frc	D-Fructose
x g	-fache Erdbeschleunigung
Gal	D-Galactose
GalNAc(SO_3H)	N-Azetyl-D-Galactosamin-6-Sulfat
GalUA	D-Galacturonsäure
Glc	D-Glucose
Glc($-CH_2-COO^-$)	Carboxymethyl-D-Glucose
GlcNAc	N-Azetyl-D-Glucosamin
GlcUA	D-Glucuronsäure
Gly	Glycerin
GulUA	L-Guluronsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HLB	Hydrophile-Lipophile Balance (Hydrophil-Lipophiles Gleichgewicht)
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography (Hochleistungsdünnschichtchromatographie)
KDO	2-Keto-3-Desoxyoktulonat
LH-Sephadex	Hydroxypropyliertes Sephadex
LPS	Lipopolysaccharide
Mal	Maltose
Man	D-Mannose
Man(OH)	D-Mannitol
ManUA	D-Mannuronsäure
MG	Molekulargewicht
nb	nicht bekannt
NB	Nährbouillon

NG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
NeuUANAc	N-Azetyl-D-Neuraminsäure
OD	Optische Dichte (Extinktion)
pI	isoelektrischer Punkt
pNpp	p-Nitrophenylpalmitat
P-Puffer	0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0
P-Wert	Übereinstimmungswahrscheinlichkeit
Rha	L-Rhamnose
RNA	Ribonukleinsäure
Sacc	Saccharose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SZ	Sorvall-Zentrifuge
t	Time (Zeit)
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UK	Units Klett (Klett-Einheiten)
Ü-Kultur	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
YPM	Peptone-Hefe-Medium
ZT	Zimmertemperatur

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
1.1.	Die Anheftung von Bakterien an Oberflächen und ihre physiologisch-ökologische Bedeutung	1
1.2.	Kurze allgemeine Biologie von *Serratia marcescens*	6
1.3.	Problemstellung	7
2.	Material und Methoden	10
2.1.	Bakterienstämme	10
2.2.	Chemikalien	11
2.3.	Geräte	12
2.4.	Nährmedien, Puffer und sonstige Lösungen	13
2.5.	Allgemeine Kulturbedingungen	14
2.6.	Keimtiterbestimmung	14
2.7.	Quantitativer Zellbindetest mit partikulärem Träger ..	15
2.8.	Agglutinationstest	17
2.9.	Größen-Fraktionierung von Sephadex	18
2.10.	Azetylierung von Sephadex G25 fine mit niedrigem Substitutionsgrad	18
2.11.	Präparative Gewinnung definierter Dextran-Oligosaccharide	19
2.11.1.	Partialhydrolyse von Dextran	19
2.11.2.	Gelchromatographie des Hydrolates	19
2.11.3.	Dünnschichtchromatographie der Oligosaccharide	20
2.12.	Vorbehandlung der Bakterien mit verschiedenen Agenzien	20
2.13.	Mutagenisierung von Bakterien	22
2.14.	Transmissions-Elektronenmikroskopie	23

Seite

2.15. Isolierung und Reinigung von Fimbrien 24
2.15.1. Gewinnung des Rohmaterials 24
2.15.2. Gelchromatographie 25
2.15.3. Gelelektrophorese 25

2.16. Chemische Bestimmungsmethoden 26
2.16.1. Kohlenhydrat 26
2.16.2. 2-Keto-3-Desoxyoktulonat (KDO) 26
2.16.3. Protein 27
2.16.4. Reduzierende Zucker 28

2.17. Enzymatische Bestimmungsmethoden 29
2.17.1. Lipase 29
2.17.2. Nuclease 29
2.17.3. Protease 30

3. Ergebnisse 31

3.1. Die Bindung von S. marcescens HY an Sephadex 31
3.1.1. Dextran als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle für die Bakterien 31
3.1.2. Abhängigkeit der Zellbindung 33
3.1.2.1. von der Bakterienkonzentration 33
3.1.2.2. von der Sephadex G25 Partikeloberfläche 38
3.1.2.3. von Anzuchtmedium und Wuchsphase der Bakterien 40
3.1.2.4. von pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur 44
3.1.3. Hemmbarkeit der Zellbindung an Sephadex G25 fine 48
3.1.3.1. Inhibitoren des Energiestoffwechsels 48
3.1.3.2. Detergenzien (Tween) 49
3.1.3.3. Proteine 53
3.1.3.4. Mono-, Oligo-, Polysaccharide 56
3.1.3.5. Isomaltooligosaccharide 62
3.1.3.6. Enzyme, Chelatbildner, Harnstoff, Perjodat 67
3.1.3.7. Hitze 70
3.1.4. Spezifität der Zellbindung 70
3.1.4.1. Ergebnisse eines screening Programmes 70
3.1.4.2. Zellbindung an chemisch modifizierte Sephadex- und Stärkepartikel 72

Seite

3.1.5. Häufigkeit der Zellbindung an Sephadex G25 fine bei verschiedenen Wildstämmen 73

3.1.5.1. Stämme von bekannten O-antigenen Serotypen 74

3.1.5.2. Frische Klinikisolate und alte Laborstämme 75

3.2. Isolierung und Charakterisierung bindedefekter Bakterienmutanten 75

3.2.1. Isolierung und Bindeverhalten der Mutanten 77

3.2.2. Wuchskinetik und Bindefähigkeit der Mutante K28 77

3.2.3. SDS-Empfindlichkeit der Mutanten 78

3.2.4. Aussehen der Mutanten im Elektronenmikroskop 79

3.2.5. Agglutinierbarkeit der Mutanten durch gelöste Polysaccharide 81

3.2.6. Extrazelluläre Enzymaktivitäten der Mutanten 82

3.3. Die Fimbrien von S. marcescens HY und Mutante K28 83

3.3.1. Isolierung und Reinigung der Fimbrien 84

3.3.2. Hemmung der Zellbindung an Sephadex G25 fine durch Fimbrienpräparate 88

4. Diskussion 90

4.1. Physiologie der Zellbindung 90

4.2. Kinetik der Zellbindung 94

4.3. Hemmung der Zellbindung 97

4.4. Bakterielle Struktur für die Zellbindung 101

4.5. Substrat-Spezifität der Zellbindung 104

4.6. Bindungstyp 107

5. Zusammenfassung 109

LITERATURVERZEICHNIS 115

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Die Anheftung von Bakterien an Oberflächen und ihre physiologisch-ökologische Bedeutung

Viele verschiedenartige Lebensräume werden von Bakterien bewohnt. Sowohl nährstoffreiche Medien, wie der Dünndarm oder die Mundhöhle des Menschen, als auch nährstoffarme Medien, kombiniert mit extremen Temperaturen (z.B. heiße Sinterterrassen), können ihnen als Standorte dienen. Im Laufe der Evolution haben Bakterien die Fähigkeit erworben, sich an häufig wechselnde Umweltbedingungen anzupassen.

An ihren natürlichen Standorten neigen viele Bakterien zur Besiedlung von Oberflächen. Zwei wesentliche Vorgänge charakterisieren diese Besiedlung: Erstens die stabile Anheftung der Bakterien an die jeweilige Oberfläche und zweitens ihre ortsgebundene Vermehrung unter den dort herrschenden Bedingungen.

Einer der wichtigsten Faktoren, der die Verteilung und die Vielfalt der Mikroorganismen in den natürlichen Ökosystemen bestimmt, ist das Angebot an organischen und anorganischen Nährstoffen. In Systemen, in denen die Nährstoffkonzentration niedrig ist, wie z.B. an einigen aquatischen oder terrestrischen Standorten, kann die Adhäsion an mit Nährstoffen angereicherten Oberflächen den Mikroorganismen ein Überleben an diesen unwirtlichen Standorten ermöglichen und sie darüberhinaus vor einer Ausscheidung aus dem System bewahren (60,95).

In natürlichen Ökosystemen bilden viele Bakterien auf inerten Oberflächen Mikrokolonien, die von einer dichten Polysaccharidschicht umgeben sind. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Kapseln bei einigen Meeresbakterien (z.B. Pseudomonas atlantica) eine faserige Struktur aufweisen und sich aus anionischen Polysacchariden zusammensetzen (14,32). Diese Matrize aus Exopolysacchariden verleiht den Zellen adhäsive Eigenschaften und befähigt sie möglicherweise, Nährstoffe und Kationen einzufangen (11). Darüberhinaus schützt sie wahrscheinlich vor

Austrocknung sowie vor Angriffen von Phagen oder anderer Mikroorganismen (z.B. Bdellovibrio) (19).

In anderen Fällen erlaubt die spezifische Bindung an unlösliche Träger, z.B. Stärke oder Cellulose, bestimmten Bakterien zellgebundene Enzyme zur Degradierung der Substrate einzusetzen, die nach ihrem Abbau für das bakterielle Wachstum genutzt werden können.

Pflanzliche und tierische Gewebe bieten eine große Vielfalt an Mikrohabitaten, die reich an Nährstoffen und anderen Wachstumsfaktoren sind und somit ideale Standorte für verschiedene Mikroorganismen darstellen. Pflanzen und Tiere besitzen jedoch auch eine Vielzahl gegen Mikroben gerichtete Abwehrmechanismen. Bakterien können also nur dann derartige Gewebe besiedeln, wenn es ihnen gelingt, den Abwehrmechanismen der potentiellen Wirte zu widerstehen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß ein Teil der natürlichen Bakterienflora einiger Tiere an eine große Anzahl verschiedener Gewebe gebunden ist (11, 81). Das autochtone Bakterium spielt nicht nur für die normale physiologische Funktion einiger Gewebe eine wichtige Rolle, es schützt sie darüberhinaus auch noch vor der Besiedlung durch andere, pathogene Organismen. Seine Beseitigung durch die Anwendung von Breitspektrum-Antibiotika begünstigt die Ansiedlung opportunistischer Krankheitserreger (43).

Die bakterielle Adhäsion ist ein komplexes Phänomen, das verschiedene physikalische, chemische und biologische Prozesse umfassen kann. Obwohl diese noch nicht vollständig bekannt sind, mehren sich die Anhaltspunkte, daß verschiedene Bakterien auf ihrer Oberfläche Moleküle besitzen, mit Hilfe derer sie mit bestimmten Molekülen auf den Zelloberflächen des Wirtes interagieren können. In vitro Experimente haben bewiesen, daß gewisse pathogene Bakterien nicht unterschiedslos an alle Arten von Gewebe adhärieren, sondern vorzugsweise an solche, die aus der bestimmten Region isoliert wurden, zu deren Besiedlung sie in vivo neigen (68). So ist z.B. darauf hingewiesen worden, daß sich viele Streptococci, Staphylococci und Pneumococci an die

endothelialen Oberflächen menschlicher Herzklappen anheften, Gram-negative Bakterien jedoch nur in geringem Umfang. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen überein, daß Gram-positive Bakterien wesentlich häufiger Infektionen der Herzklappen verursachen als Gram-negative (41).

Besonders deutlich wird die gegenseitige Spezifität der Zell-Zell Interaktion in der symbiotischen Verbindung zwischen dem Bodenbakterium Rhizobium und bestimmten Leguminosen. Diese Symbiose ist für die Landwirtschaft von großer Bedeutung, da sie die Hauptquelle für die terrestrische Bindung von atmosphärischem Stickstoff darstellt. Die Gattung Rhizobium wird in 6 Spezies und eine gemischte Gruppe eingeteilt, deren Hauptunterschied in den Wirtpflanzen liegt, die sie infizieren, um Knöllchen zu bilden (19). In der Lektinerkennungshypothese wird die Möglichkeit erwogen, daß spezifische Lektine an der Oberfläche der Wurzelhaare der Leguminosen ausschließlich mit bestimmten Polysaccharidstrukturen interagieren, die nur auf dem geeigneten Rhizobium-Symbioten vorkommen (17,46,93). Untersuchungen von Bohlool und Schmidt verdeutlichen die Bedeutung des Lektins für die Wirtspezifität in der Rhizobium-Leguminose Symbiose. Sie zeigten, daß ein Präparat aus Sojabohnenlektin ausschließlich an R. japonicum-Zellen bindet, die in der Lage sind, Sojabohnenknöllchen zu verursachen (04). Nachfolgend isolierten und charakterisierten Dazzo und Hubbell ein Lektin aus Kleewurzeln, das spezifisch infektiöse R. trifolii-Zellen agglutiniert (16). Die Natur des Lektinrezeptors auf der Rhizobium-Oberflache wurde bisher noch nicht eindeutig bestimmt. Wahrscheinlich spielen jedoch zellgebundene Exopolysaccharide (16) und/oder O-Antigen-Komponenten der Lipopolysaccharide (93) eine wichtige Rolle bei der Knöllchenbildung.

Eines der am besten dokumentierten Beispiele einer spezifischen Adhasion ist die des Bakteriums Streptococcus mutans, einem der Erreger der Zahnkaries. S. mutans synthetisiert mit Hilfe der zellgebundenen Glucosyl- und Fructosyltransferasen Glucane und Fructane aus Saccharose, die aus der Nahrung des Wirtes stammt (35). Die de novo Synthese wasserunlöslicher Glucane ist eine unentbehrliche Vor-

aussetzung für eine dauerhafte und stabile Adhäsion des Bakteriums an die Zahnoberfläche und seine Vermehrung an diesem Standort (35). Mutanten, die keine oder nur mangelhaft wasserunlösliche Glucane synthetisieren können, sind nämlich unfähig, Zahnbelag in bedeutenden Mengen zu bilden. Diese Stämme verursachten bei Versuchstieren außerdem erheblich weniger Karies (86).

Die spezifische Adhäsion enteropathogener Stämme von Escherichia coli (EPEC) an die Epithelschleimhaut des menschlichen Dünndarms veranschaulicht die Bedeutung dieses Phänomens in einigen pathologischen Prozessen. Charakteristisch für diese Stämme ist die Besiedlung des Dünndarms, in dem sie sowohl hitzelabile als auch hitzestabile Enterotoxine bilden, welche Diarrhöe verursachen. Die für die Interaktion mit dem Epithelgewebe verantwortlichen bakteriellen Liganden haben die Namen CFA/I und CFA/II (engl. Colonization Factor Antigen) erhalten (26,27). Satterwhite et al. haben bewiesen, daß ein Derivat eines EPEC-Stammes, das zwar in der Lage ist, hitzelabile Enterotoxine zu produzieren, aber seine Fähigkeit zur Besiedlung verloren hat (CFA^-), bei freiwilligen Versuchspersonen keine Diarrhöe hervorruft (80).

Die aus Tieren isolierten EPEC-Stämme mit den Antigenen K88 (Ferkel) und K99 (Kälber, Lämmer, Schweine) sind bereits wesentlich intensiver erforscht worden, als die Adhäsionsfaktoren der von Menschen stammenden EPEC-Isolate. K88 und K99 Antigene sind, wie die CFA-Faktoren beim Menschen, hitzelabile, pilusähnliche Oberflächenstrukturen, deren Synthese durch ein übertragbares Plasmid kodiert wird (28,70,84). Untersuchungen verschiedener Autoren zeigen, daß die Eliminierung des Plasmids gleichbedeutend mit dem Verlust der Fähigkeit des Bakteriums ist, den Dünndarm zu besiedeln und dort Diarrhöe hervorzurufen (50,51,83). Zahlreiche Versuchsergebnisse offenbaren, daß das Antigen K88 eine wichtige Rolle in der Pathogenität der EPEC-Stämme spielt: Es wurde eindeutig nachgewiesen, daß dieses Antigen in vivo im Dünndarm synthetisiert wird (50). Bei Ferkeln, die von mit gereinigten K88-Fimbrien immunisierten Muttertieren gesäugt worden waren, verursachte eine spätere Ino-

kulation mit K88 enthaltenden EPEC-Stämmen keine Diarrhöe (78).

Wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben wurde, sind bakterielle Adhäsionsphänomene an einer außerordentlich großen Anzahl von biologischen Prozessen beteiligt. Die Biodegradation organischer Substanzen, der Aufbau einiger für die Landwirtschaft und Viehzucht wichtiger symbiotischer Verbindungen sowie die Entwicklung gewisser Krankheiten bei Pflanzen, Tieren und Menschen hängen primär oder teilweise von der Fähigkeit der Mikroorganismen ab, sich an die relevanten Oberflächen anheften zu können. Durch das Verständnis der an diesen mikrobiellen Adhäsionsvorgangen beteiligten molekularen Mechanismen ist es möglich, das Grundlagenwissen über die Physiologie von Mikroorganismen, Pflanzen, Tieren und Menschen zu erweitern. Diese Erkenntnisse können dazu verhelfen, neue Therapien zu entwickeln, die pathologische Prozesse verhüten oder zumindest verringern.

Für eine weitergehende Darstellung der gegenwärtigen wissenschaftlichen Einschätzung der bakteriellen Adhäsion siehe:

- Bitton, G. and Marshall, K.C. (eds.): Adsorption of microorganisms to surfaces. Wiley & Sons, New York-Chichester-Brisbane-Toronto (1980), 464 S.
- Ellwood, D.C., Melling, J. and Rutter, P. (eds.): Adhesion of microorganisms to surfaces. Academic Press, London (1979), 268 S.
- Beachey, E.H. (ed.): Bacterial adherence. Chapman & Hall, London (1980), 600 S.

1.2. Kurze allgemeine Biologie von Serratia marcescens

Die Gattung Serratia gehort zur Familie der Enterobacteriaceae. Die Taxonomie dieser Gattung ist noch immer uneinheitlich. Während in der 8. Edition des Bergey's Manual S. marcescens als einzige Spezies anerkannt wird (09), berichten Grimont et al. aufgrund taxonomischer Untersuchungen über die Existenz von zumindest vier verschiedener Spezies: S. marcescens, S. marinorubra, S. plymuthica und S. liquefaciens (45).

Die Zellen von S. marcescens haben die Form gerader Stäbchen und zeichnen sich u.a. durch die Fermentation von Glucose und Adonitol aus. Sie sind dagegen unfähig, Lactose, Xylose und Inulin zu fermentieren. Auf den Voges-Proskauer-Test reagieren sie positiv. Einige Stämme produzieren ein rötliches Pigment (Prodigiosin). S. marcescens bildet verschiedene extrazelluläre Enzyme, wie z.B. Protease, Nuclease und Lipase, darüberhinaus auch Bakteriocine (Marcescine) und Exopolysaccharide.

S. marcescens konnte aus Proben isoliert werden, die aus dem Wasser, dem Boden und von Pflanzen stammten. Es ist in der Lage, die Oberflächen einiger Pflanzen zu besiedeln; seine Rolle an diesem Standort ist jedoch unbekannt.

S. marcescens ist häufig als ein potentielles Pathogen für einige Insekten bezeichnet worden, wobei ein Zusammenhang zwischen dieser Pathogenität und der Produktion von Exoenzymen zu bestehen scheint. Gewöhnlich findet sich S. marcescens in eßbaren Meerestieren wie Austern oder frischem Fisch, durch die es auf den Menschen übertragen werden kann. Es wird heute allgemein als ein opportunistischer Krankheitserreger für den menschlichen Organismus angesehen, da es häufig Infektionsprozesse bei Patienten verursacht, deren Abwehrsystem geschwächt ist, sowie bei Personen, die aufgrund einer Obstruktion der Harnwege, einer haufigen Katheteranlegung oder der Einführung eines Tubus in die Atemwege für eine bakterielle Infektion besonders empfänglich sind.

Multiple, oft durch R-Plasmide übertragene Antibioti-

kum-Resistenz kommt oft bei nosokomialen Serratia-Stämmen vor. Eine ausgedehnte oder wiederholte Behandlung von Menschen mit Antibiotika kann die natürliche Bakterienflora der Patienten vernichten und die Ansiedlung des mehrfach antibiotikaresistenten Organismus begünstigen (12,44,45).

Die einschlägige neuere Fachliteratur über S. marcescens umfaßt über 100 Originalarbeiten, Reviews und ein Buch. Siehe z.B.:

- Grimont, P.A.D., Grimont, F. and Dulong de Rosnay, H.L. C.: Taxonomy of the genus Serratia. J. Gen. Microbiol. 98 (1977), S. 39-66.
- Grimont, P.A.D. and Grimont, F.: The genus Serratia. Ann. Rev. Microbiol. 32 (1978), S. 221-248.
- Graevenitz, A. von and Rubin, S.J.: The genus Serratia. CRC Press, Florida (1980).

3. Problemstellung

Kürzlich wurde darüber berichtet, daß die Bildung extrazellulärer Lipase (Exolipase) bei einigen Wildstämmen von S. marcescens durch die Zugabe exogener Polysaccharide erheblich gesteigert wird. Von 21 getesteten Polysacchariden waren jedoch nur 5 in der Lage, die Bildung von Exolipase zu stimulieren (92). Als einen Versuch, den Wirkungsmechanismus des Polysaccharideffekts zu verstehen und zu erklären, stellten Winkler und Stuckmann die Detachment-Hypothese auf (95). In dieser Hypothese wird angenommen, daß die stimulierenden Polysaccharide unmittelbar an der Oberfläche von S. marcescens wirken. Im Verlauf der Untersuchungen wurde beobachtet, daß verschiedene Polysaccharide vom Polyglucan-Typ, z.B. Pullulan und Dextran, mit Serratia-Zellen interagierten und grobe Agglutinate bildeten. Bei der Verwendung partikulären Dextrans (Sephadex) anstelle des wasserlöslichen Polysaccharides stellte sich heraus, daß sich S. marcescens-Zellen an diese Partikel anheften konnten.

Sephadex, ein Produkt der Firma Pharmacia, ist ein mit Epichlorhydrin vernetztes Dextran in perlierter Form; die Glucosereste sind zu 95 % α 1-6 und zu 5 % α 1-3 glykosidisch verknüpft (Abb. 1).

Obwohl schon bekannt ist, daß S. marcescens zur Besiedlung von Biotopen fähig ist (44), sind bisher keine Untersuchungen über die molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen Serratia und Oberflächen veröffentlicht worden. Die Bindung von S. marcescens HY an partikuläres Dextran wurde in dieser Arbeit als ein Modell für die Untersuchung der wechselseitigen Erkennung und Interaktion von Makromolekülen gewählt.

Erstes Ziel der Arbeit war, einen geeigneten Test zu entwickeln, mit dem sich diese Interaktion möglichst schnell, einfach und reproduzierbar messen ließ. Es sollte untersucht werden, ob die Zelladhäsion von verschiedenen Milieufaktoren abhängig ist. Besondere Berücksichtigung fanden der Einfluß von pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke, Wuchsphase und Anzuchtmedium. Die Einwirkung metabolischer Gifte auf S. marcescens diente zur Beantwortung der Frage, ob die Bindung ein energieabhängiger Vorgang ist. Weiterhin sollte bestimmt werden, ob der Zusatz chemisch definierter Moleküle, wie Mono-, Di- und Polysaccharide sowie Proteine, einen Einfluß auf die Bindefähigkeit ausübt. Derartige "Kompetitions-Versuche" halfen schon oftmals, z.B. bei der Erforschung des ABO-Blutgruppensystems oder der Lektine, Einblicke in die chemische Natur der an Interaktionen beteiligten Liganden zu gewinnen. Es war ebenfalls geplant, die Bakterien vor dem Vermischen mit Sephadex mit verschiedenen Substanzen (Enzyme, EDTA, Harnstoff u.a.) zu behandeln, um zu prüfen, ob dadurch ihre Bindefähigkeit beeinträchtigt wird. Mit diesen Versuchen verband sich die Erwartung, Rückschlüsse auf die chemische Natur der für die Bindung notwendigen bakteriellen Strukturen ziehen zu können. Leive et al. fanden z.B., daß eine EDTA-Behandlung von E. coli über 50 % der LPS der äußeren Membran ablösen kann (58). Eine weitere Aufgabe der Arbeit bestand darin, Mutanten von S. marcescens HY zu isolieren, die ent-

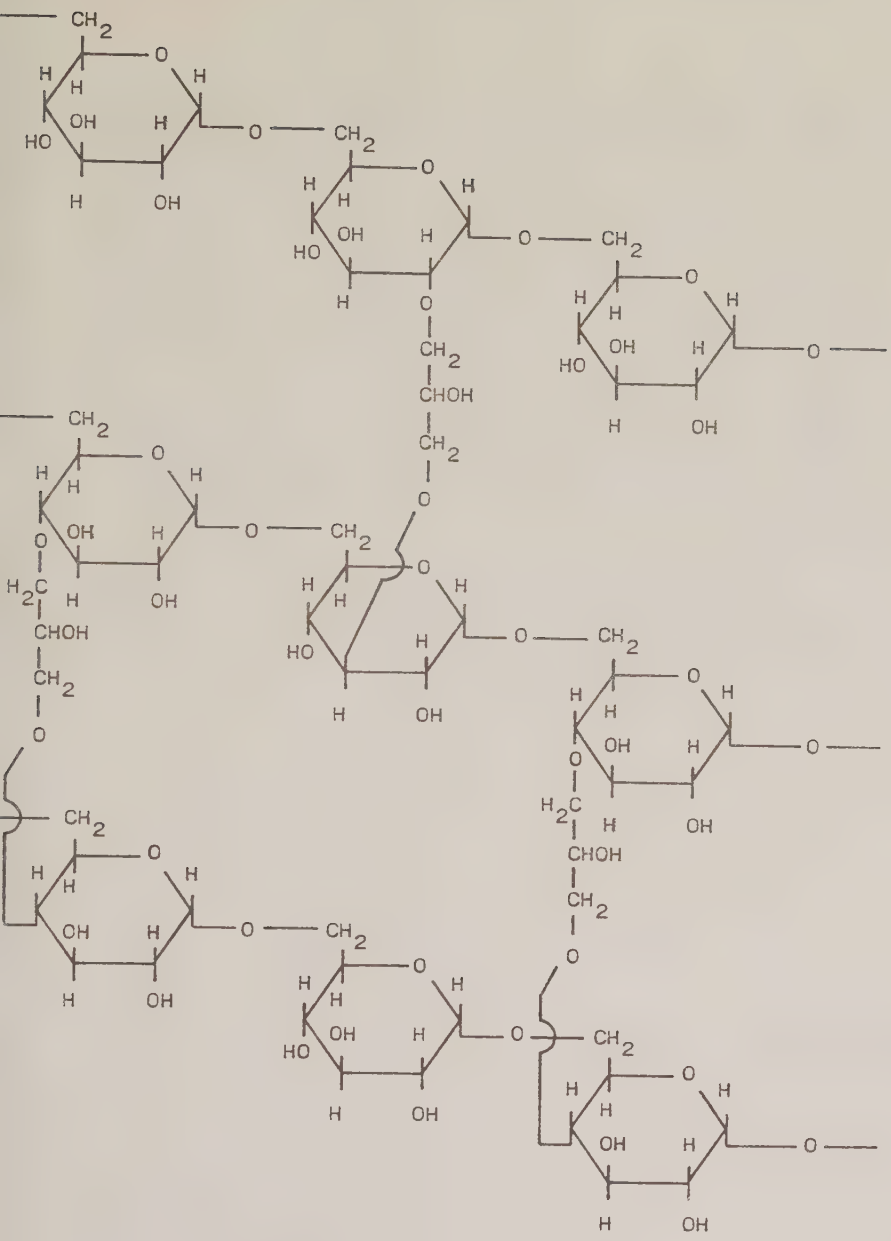

Abb. 1: Sephadex.

Entnommen aus Görlich (40).

weder eine geringere oder gar keine Bindefähigkeit an Sephadex aufweisen. Die Isolierung von Mutanten mit bestimmten funktionellen Ausfallserscheinungen und ihr physiologischer und morphologischer Vergleich mit dem zugehörigen Wildtyp sind inzwischen "klassische Methoden" der Mikrobiologie. Im Vordergrund der Untersuchung stand eine elektronenmikroskopische Überprüfung, ob nichtbindefähige Serratia-Mutanten Fimbrien (Pili) besitzen. Im nächsten Schritt sollten die für die Interaktion mit Sephadex verantwortlichen Zellstrukturen isoliert, gereinigt und charakterisiert werden. Abschließend wurde eine Untersuchung der für die Interaktion mit S. marcescens notwendigen chemisch-strukturellen Voraussetzungen der Polyglucane angesetzt.

Diese Experimente können dazu beitragen, einen Einblick in die molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen S. marcescens und Sephadex zu erlangen.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme

In der nachfolgenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten S. marcescens-Stämme aufgeführt. Sämtliche Stämme sind prototroph. Sie wurden freundlicherweise von Prof. Dr. U. Winkler, Bochum, zur Verfügung gestellt.

Stamm Nr.	Synonyme	Ursprüngliche Herkunft	Bemerkungen
I. Laborstämme			unbekannter Serotyp
W 225	HY (y,ψ)	Dr. R.W. Kaplan, Frankfurt	
W 244	K (ɣ)	"	
W 272	E 2	Dr. H. Prinsloo, Südafrika	
W 1113	HY (y,ψ)⁻	Dr. H. Steiger, Frankfurt	
W 1659	Sma	Dr. J. Collins, Braunschweig	
W 1684	ATCC-25179	Dr. C. Tabor, Bethesda	
W 1694	Sr 20 (PS 20)	Dr. H. Matsumoto, Japan	
W 1128	SM-6-F'-Lac⁺	Dr. S. Falkow, Washington, D.C.	
K 9	-	diese Arbeit	Derivate von W 225; Sephadex-bindedefekte Mutanten
K 28	-	"	
			bekannte O und H Serotypen
W 1517	862-57	Dr. B. Davis, Atlanta	O_6H_3
W 1518	864-57	"	O_4H_4
W 1519	866-57	"	O_1H_5
W 1528	868-57	"	O_2H_1
W 1529	867-57	"	O_5H_1
W 1531	1604-55	"	O_8H_3
W 1532	4534-60	"	O_9H_{11}

Stamm Nr.	Synonyme	Ursprüngliche Herkunft	Bemerkungen
W 1534	1914-63	Dr. B. Davis, Atlanta	$O_{11}H_{nb}$
W 1538	4523-60	"	$O_{15}H_{8}$
II. Frische Klinikisolate			unbekannter Serotyp
W 1766	v 262	Dr. K. Opferkuch, Bochum	aus Venülen Blut
W 1767	w 240	"	aus Urin
W 1768	w 251b	"	"
W 1769	w 277b	"	aus Sputum
W 1770	v 463	"	aus Blutkultur
W 1771	3618	"	nb
W 1772	v 1119	"	aus Katheterspritze
W 1773	v 361	"	aus Blutkultur

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme.

2.2. Chemikalien

Alginate Industries GmbH, Hamburg: Alginsäure, Na-Salz.

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim: Aldolase, α 1,4 → α 1,6 Amyloglucosidase, Alkoholdehydrogenase, Ribonuclease A, Rinderserumalbumin, Pepsin.

Bio Rad Laboratories, Richmond (USA): Bio Gel P2, Bio Gel P4, Bio Gel A 50m.

Calbiochem Behring Corp., La Jolla (USA): Colominsäure, Na-Salz.

Corning Glas Works, Corning, New York (USA): Corning controlled Pore Glas.

Difco Laboratories, Detroit (USA): Kulturmedien.

Kartoffelstärke Schrobenhausen eG, Schrobenhausen: Fibraffin K (Stärkeaminether), Spezialstärke 2003 (Distärkephosphat), Spezialstärke 2345 (Azetyliertes Distärkephosphat),

oxidativ depolymerisierte Kartoffelstärke.

Maizena GmbH, Hamburg: Hydroxypropylierte Maisstärke, Azetylierte Maisstärke.

Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala (Schweden): Dextran T Fraktionen, DEAE-Dextran, Sephadex G25 (coarse, medium, fine, superfine), LH-Sephadex, Cytodex.

Merck AG, Darmstadt: Stärke, Stärke (löslich), Tween (20, 40, 60, 80), Na-Desoxycholat, Na-Dodecylsulfat, Gummi arabicum.

Roth KG Chemische Fabrik, Karlsruhe: Laminarin.

Sigma Chemical Company, St. Louis (USA): Mannan, Polygalakturonsäure, Na-Salz, Avidin, Concanavalin A, Fetuin, Fibrinogen, γ-Globulin, Myoglobin, Ovalbumin, Ovomucoid, Ribonuclease B, α-Amylase, 2-Keto-3-Desoxyoktulonat, Dextranase.

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Serva, Heidelberg, bezogen. Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad "p.a." oder "reinst", soweit erhältlich. Pullulan wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. K. Wallenfels, Freiburg, zur Verfügung gestellt. Von Dr. W. Hartmeier von der Firma Boehringer, Ingelheim, erhielten wir gehärtete Gelatinepartikel.

.3. Geräte

Rotationsschüttler, New Brunswick G10; Schüttelwasserbad, New Brunswick G76; Heraeus-Christ-Laborzentrifuge, Typ 00702; Sorvall Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge, Typ RC2-B; Gefriertrockenanlage, WKF L2-70; Fraktionssammler, LKB-Ultrorac; Laminares Mikro-Durchfluß-Differential Refraktometer (Lamidur 78), Winopal mit Kompensationsschreiber, Recorder 3212; Lichtmikroskop, Typ 4, Zeiss; Okularmikrometer und Objektmikrometer, Zeiss; Hochvakuum-Bedampfungsanlage, Balzers Union BAE 080; Elektronenmikroskop, Siemens Elmiskop 101; Spektralphotometer, Typ PMQII, Zeiss; Photometer, Klett-Summerson, Modell 8003 (Grünfilter Nr. 54); Waring blendor, Lange & Rehberg.

2.4. Nährmedien, Puffer und sonstige Lösungen

Alle Anzuchtmedien und Glasmaterialien, bei denen Sterilität erforderlich war, wurden 15 min bei 121°C und ca. 1 kp/cm^2 Oberdruck autoklaviert.

Nährbouillon (NB), NB-Agar, NB-Weichagar, M9 Minimalagar und M9 Minimalmedium (Glc als C-Quelle) nach Winkler et al. (91).

M9 Maltose-, M9 Glycerin- und M9 Saccharose-Medien: Zusammensetzung wie das M9 Minimalmedium, anstatt Glucose aber Maltose, Glycerin oder Saccharose als C-Quelle.

Supplementiertes M9 Minimalmedium: M9 Minimalmedium + 0,25 % (w/v) Casaminoacids (Difco).

M9 Minimal-SDS-Agar: M9 Glc-Agar + 0,25 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS).

Peptone-Hefe-Medium (YPM): 7,5 g Hefe-Extrakt + 7,5 g Bacto-Pepton + 5,0 g NaCl + 1,0 g $Na_2HPO_4.2H_2O$, mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.

0,1 M Natriumazetat-CH_3COOH-Puffer (pH 3,7-5,6), 0,1 M Sørensen-Natriumphosphatpuffer (pH 5,8-8,0) und 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,1-8,9) nach McKenzie und Dawson (62).

0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0 (P-Puffer) nach Winkler et al. (91).

0,05 M Phosphatpuffer, pH 8,0 (Lipase Test): 94,5 ml 0,05 M KH_2PO_4 + 5,5 ml 0,05 M $Na_2HPO_4.2H_2O$.

0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,6 (Protease Test): 13,2 ml 0,1 M KH_2PO_4 + 86,8 ml 0,1 M $Na_2HPO_4.2H_2O$.

0,4 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,8 mit 0,04 M $MgCl_2$ (Nuclease Test): 48,4 g Tris + 8,1 g $MgCl_2.6H_2O$ in 800 ml A. dest. lösen und mit 1 N HCl auf pH 8,8 einstellen. Anschließend mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen.

Paraformaldehyd-Glutaraldehyd-Fixierlösung: 100 mg Paraformaldehyd-Pulver bei 65°C unter ständigem Rühren in A. dest. lösen. Einige Tropfen 0,1 N NaOH hinzufügen, um eine möglichst klare Lösung zu erhalten. Nach Abkühlung der

Lösung 2 ml einer 50 %igen Glutaraldehydlösung zugeben. Mit 0,1 M Sørensen-Phosphatpuffer, pH 7,4 auf 50 ml auffüllen. End-pH-Wert der Lösung = 7,2. (Modifikation des Rezeptes von Karnowsky, 47).

.5. Allgemeine Kulturbedingungen

Bakterienanzucht:

Die Bakterienstämme wurden auf NB-Agarplatten bei 4°C aufbewahrt. Ansätze zu je 10 ml Flüssigmedium wurden mit Bakterien von den NB-Stammplatten angeimpft (Endkonzentration ca. 2 x 10^7 Zellen/ml). Zur Gewinnung "stationärer" Kulturen wurde die Zellsuspension 20-22 h in einem Rollapparat (33 Upm) bei 30°C bebrütet; der maximale Zelltiter betrug etwa 6 x 10^9/ml (M9 Glc-Medium). Kulturen, die schon nach kurzer Bebrütungsdauer einen Zelltiter von etwa 3-6 x 10^8/ml erreicht hatten, wurden als "logarithmische" bezeichnet.

Waschen der Bakterien:

Alle verwendeten Bakteriensuspensionen wurden, falls nicht anders vermerkt, zweimal gewaschen. Dies erfolgte durch Zentrifugation der Kulturen in einer Sorvall-Zentrifuge (10 min, 5900 x g, Rotor SS34) und Resuspension des Bakteriensediments in der dem ursprünglichen Volumen entsprechenden Menge 0,85 % NaCl oder 0,1 M P-Puffer, pH 7,0.

Gewinnung von Kulturüberständen:

Die Kulturen wurden in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (10 min, 2442 x g, Rotor SS34) und die Sedimente verworfen. Die Überstände wurden erneut zentrifugiert (10 min, 10886 x g) und bis zu ihrem Gebrauch in ein Eisbad gestellt.

.6. Keimtiterbestimmung

Die Kulturen wurden in 0,1 M P-Puffer, pH 7,0, verdünnt. Je 0,1 ml der verdünnten Proben wurden jeweils in 3 ml NB-Weichagar (47°C) pipettiert, gut vermischt und auf eine NB-

Agarplatte gegeben. Die Bebrütung der Platten erfolgte 24-48 h bei 30°C. Die Kolonien wurden gezählt und der Keimtiter berechnet.

2.7. Quantitativer Zellbindetest mit partikulärem Träger

Vorbereitung des Trägers:

Bei der Mehrzahl der Experimente wurde Sephadex G25 fine als Träger verwendet. Ausnahmen werden im Text erwähnt. 15 g Sephadex G25 fine (bzw. die jeweilige andere Trägersubstanz) wurden mit 450 ml A. dest. über einer Schott-Nutsche gewaschen, um eventuelle Verunreinigungen zu beseitigen. Anschließend wurde der Träger in 150 ml Ethanol resuspendiert. Nachdem die Partikel sich abgesetzt hatten, wurde der Überstand dekantiert, der Träger bei 40°C getrocknet und über Silika-Gel im Exsikkator aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde eine bestimmte Menge des Trägers in der für den Versuch zu verwendenden Lösung resuspendiert (z.B. 90 mg Sephadex G25 fine in 1 ml P-Puffer). Das Gemisch verblieb bis zum Quellen des Gels mindestens 12 h bei 6°C. Vor allen Bindeversuchen wurde das Flüssigkeitsaufnahmevermögen der Trägersubstanzen bestimmt (siehe folgender Abschnitt) und der Partikelsuspension ggf. noch Flüssigkeit zugesetzt.

Berechnung des Pufferaufnahmevermögens:

Zu einer bestimmten Menge Trägersubstanz in 1 ml P-Puffer wurde 1 ml einer Suspension des nicht bindefähigen Bakterienstammes W 1128 gegeben (Zelltiter 4 x 10^9/ml) und beides gut vermischt. Der Ansatz wurde 10 min bei ZT belassen und anschließend der Zelltiter (Neubauer-Zählkammer) und die Extinktion (OD_{580}) des Überstandes bestimmt. Nachdem der Verdünnungsfaktor der Zellsuspension berechnet worden war, wurde der Probe eine bestimmte Menge P-Puffer hinzugefügt, welche dem Flüssigkeitsaufnahmevermögen des Gels entsprach. Die Zellsuspension im Ansatz wurde somit genau 1:2 verdünnt.

Beispiel: 90 mg Sephadex G25 fine in 1 ml P-Puffer + 1 ml Zellsuspension (Zelltiter 4 x 10^9/ml) ergaben eine

Zellsuspension mit einem Zelltiter von 2,25 x 10^9/ml, d,h. eine Verdünnung der Suspension von 1:1,78. 11 % der Gesamtflüssigkeit wurde vom Gel aufgenommen. Um die Zellsuspension genau 1:2 zu verdünnen, wurden dann 220 µl P-Puffer hinzugefügt.

Standard Bindetest (batch Verfahren):

Zur Bestimmung der Bindefähigkeit eines Stammes wurden normalerweise stationäre, in M9 Glc-Medium gezüchtete Kulturen verwendet. Die Kulturen wurden zweimal mit P-Puffer gewaschen (siehe 2.5.) und anschließend in dem gleichen Puffer resuspendiert (Zelltiter 4 x 10^9/ml). Die Versuchsansätze bestanden aus:

I. 90 mg Sephadex G25 fine in 1,22 ml P-Puffer und 1 ml Bakteriensuspension (Probe),
II. 1 ml P-Puffer und 1 ml Bakteriensuspension (Kontrolle A),
III. 90 mg Sephadex G25 fine in 1,22 ml P-Puffer und 1 ml P-Puffer (Kontrolle B).

Die Ansätze wurden 30 min im Rollapparat (33 Upm) bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Reagenzgläser 10 min bei ZT belassen, um das Absetzen der Sephadexpartikel zu ermöglichen. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß das Absetzen von Sephadex G25 fine unter o.g. Bedingungen innerhalb von 4 min geschah. Aus den Überständen jedes Ansatzes wurden jeweils 1 ml Probe entnommen und ihre Extinktion (OD_{580}) bestimmt. Die Bindung eines Stammes wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Freie Zellen im Überstand (FZÜ)} = \frac{(OD_I - OD_{III}) \times 100}{OD_{II}} \ (\%)$$

Anteil gebundener Zellen (in %) = 100 - % FZÜ

Bei einigen Experimenten wurde der Standard Bindetest modifiziert. Auf solche Abweichungen wird im Text hingewiesen.

Hemmtest:

In einigen Experimenten wurde die Hemmwirkung gewisser Substanzen auf die Bindung von S. marcescens HY an Sephadex untersucht. Zu diesem Zweck wurde in neutralem P-Puffer eine Stammlösung der zu testenden Substanz hergestellt. Da-

nach wurden gleiche Volumina dieser Stammlösung und einer Zellsuspension in neutralem P-Puffer vermischt (Zelltiter 8 x 10^9/ml). Die sich daraus ergebende Suspension wurde dann für den Bindetest verwendet (siehe Standard-Bindetest).

In allen Fällen wurde parallel der Anteil gebundener Zellen der Bakteriensuspension ohne Hemmsubstanz bestimmt (positive Kontrolle). Um den Prozentsatz der Hemmung zu berechnen, wurde der Wert des Anteils gebundener Zellen in der Kontrolle gleich 100 % gesetzt.

Beispiel: Der Anteil gebundener Zellen eines Stammes betrug 45 %. Nach Zugabe eines Polysaccharides wurden nur 20 % errechnet, d.h. nur 20 % der eingesetzten Zellen konnten an Sephadex binden. Somit wurde die ursprüngliche Zellbindung nach Einwirkung des Inhibitors zu 55,5 % gehemmt.

2.8. Agglutinationstest

In M9 Glc-Medium gezüchtete Kulturen wurden gewaschen (siehe 2.5.) und die durch Zentrifugation gewonnenen Zellsedimente in auf 30°C vorgewärmten P-Puffer, pH 7,0, gegeben. Die Zellzahl der Suspension betrug etwa 4 x 10^9/ml (OD_{580} = 1,6). Jeweils 1 ml Bakteriensuspension wurde mit 1 ml P-Puffer zusammengegeben, in dem ein zu untersuchendes Polysaccharid gelöst war. Als Kontrollen dienten Ansätze, die anstatt der Polysaccharidlösung bzw. Bakteriensuspension eine entsprechende Menge P-Puffer enthielten. Die Proben wurden im Rollapparat (33 Upm) bei 30°C inkubiert und nach 30 min im durchfallenden Licht einer hinter die Reagenzgläser gehaltenen Lampe und/oder mit Hilfe des Lichtmikroskops auf das Vorhandensein von Zellagglutinaten hin untersucht.

Bei einigen Experimenten wurde der Agglutinationstest etwas modifiziert. Auf solche Abweichungen wird im Text hingewiesen.

9. Größen-Fraktionierung von Sephadex G25

Die von der Firma Pharmacia erhältlichen Sephadex G25-Typen coarse, medium und superfine wurden in trockenem Zustand durch Nylon-Gewebe definierter Maschenöffnung fraktioniert. Das Gewebe wurde vor dem Siebvorgang straff auf einen Rahmen gespannt. Anschließend wurde das Sephadex aufgetragen und mit einem Pinsel vorsichtig hin und her bewegt. Insgesamt wurde von jedem Sephadex-Typ 1,0 g gesiebt. In der folgenden Tabelle sind einige Charakteristika der verwendeten Siebgewebe (Schweizer Seidenfabrik Thal) und der mit ihnen gesiebten Sephadex-Typen zusammengestellt:

Sephadex		Siebgewebe	
Typ	Partikeldurchmesser (µm)[a,b]	Typ	Maschenöffnung (µm)[a]
superfine	10 - 40	P-414	30
medium	50 - 150	PP-140-619	105
coarse	100 - 300	PP-80-560	177

Tab. 2: Ausgewählte Charakteristika der Sephadex-Typen und Siebgewebe.

[a] Angaben des Herstellers
[b] In trockenem Zustand gemessen

10. Azetylierung von Sephadex G25 fine mit niedrigem Substitutionsgrad

Sephadex G25 fine wurde nach einer auf den Verfahren von Wolff et al. und Whistler et al. zur Azetylveresterung von Stärke basierenden Methode azetyliert, die von Wurzburg beschrieben wurde (94). Das Sephadex G25 fine (4,0 g Trockengewicht) wurde in 12 ml A. dest. (25°C) gegeben und 6 h bei ZT belassen, um das Quellen des Gels zu ermöglichen. Mit

Hilfe eines magnetischen Rührers wurde die Suspension dann in gemäßigte Bewegung versetzt, die während des gesamten Versuchs beibehalten wurde. Als die Sephadexpartikel gleichmäßig im Wasser verteilt waren, wurde die Mikroelektrode eines pH-Meters in die Suspension eingesetzt und der pH-Wert durch tropfenweise Zugabe einer 3 %igen NaOH-Lösung auf 8,0 eingestellt. Danach wurde der Sephadexsuspension langsam und tropfenweise Essigsäureanhydrid (5 ml ≙ 5,4 g) zugegeben, gleichzeitig aber auch weiterhin die 3 %ige NaOH-Lösung in ausreichendem Maße zugeführt, um den pH-Wert konstant bei 8,0-8,5 zu halten. Als das gesamte Essigsäureanhydrid zugegeben war, wurde der pH-Wert mit 0,5 N HCl auf 4,5 eingestellt. Die Suspension wurde mit 4 l A. dest. über einer Schott-Nutsche gewaschen und in 30 ml 75 %igem Ethanol resuspendiert. Nachdem sich die Sephadexpartikel abgesetzt hatten, wurde der Überstand dekantiert und das Sephadex bei 40°C getrocknet. Es wurde dann im evakuierten Exsikkator solange über Silika-Gel weiter getrocknet, bis das Gewicht konstant war.

2.11. Präparative Gewinnung definierter Dextran-Oligosaccharide

2.11.1. Partialhydrolyse von Dextran

Die Hydrolyse wurde nach der Anleitung von Wandersman et al. (89) für die Partialhydrolyse von Amylose durchgeführt.

10 g Dextran T70 (MG ca. 70 x 10^3) wurden in 50 ml auf 100°C erhitzte 1 N H_2SO_4 gelöst und 30 min bei 100°C hydrolysiert. Danach wurden dem Ansatz 50 ml eiskaltes A. dest. hinzugefügt. Zur Neutralisation des Hydrolates wurde festes $Ba(OH)_2.8H_2O$ verwendet. Die entstandene Suspension wurde dreimal in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (10 min, 5900 x g, Rotor SS34), um festes $BaSO_4$ zu entfernen. Der Überstand wurde eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

2.11.2. Gelchromatographie des Hydrolates (23)

Säulenfüllung: Bio Gel P4

Trennmedium: Autoklaviertes A. dest.

Säule mit äußerem Temperiermantel: Innendurchmesser = 5 cm, Füllhöhe = 142 cm, Volumen = 2788 ml

Durchflußgeschwindigkeit: ca. 50 ml/h

Ausschlußvolumen: 801 ml (mit Blue Dextran 2000 bestimmt)

Fraktionen: 460 à 6,43 ml

Probevolumen: 30 ml; Kohlenhydratgehalt: 3,76 g/Vol.

Während des Trennverfahrens wurde die Säule auf einer Temperatur von 50°C gehalten. Die Elution der verschiedenen Oligosaccharide wurde mit einem Differential-Refraktometer verfolgt, an dem ein Kompensationsschreiber angeschlossen war.

11.3. Dünnschichtchromatographie der Oligosaccharide

Methode nach Nurok und Zlatkis (67)

Platten: HPTLC-Fertigplatten/Kieselgel 60, 10 x 10 cm (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: n Butanol-Ethanol-H_2O im Verhältnis 2:2:1 (v/v)

Sprühlösung: 20 %ige H_2SO_4

Auf die Chromatographieplatten wurden in 1 cm Abstand voneinander je 5 µl der verschiedenen Eluatfraktionen aufgetragen und getrocknet. Als Referenzsubstanzen dienten D-Glucose, Maltose, Isomaltose und Isomaltotriose. Das Chromatogramm wurde sechsmal hintereinander entwickelt und zwischen den Läufen mit einem Föhn getrocknet. Die Platten wurden mit 20 %iger H_2SO_4 besprüht, getrocknet und 15 min bei 110°C erhitzt. Die Oligosaccharide bildeten braune Flecken.

12. Vorbehandlung der Bakterien mit verschiedenen Agenzien

Zur chemischen bzw. enzymatischen Vorbehandlung von S. marcescens HY wurde, falls nicht anders vermerkt, eine stationäre, in M9 Glc-Medium gezüchtete Kultur verwendet. Die Kultur wurde 10 min in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (5900 x g, Rotor SS34) und in den entsprechenden Puffern bzw. Lösungen resuspendiert (Zelltiter = 6 x 10^9/ml). Kon-

trollansätze, die keine zu untersuchende Substanz enthielten, wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde die Extinktion (OD_{580}) der vorbehandelten Proben und die der Kontrollen bestimmt. Danach wurden die Zellsuspensionen zweimal mit 0,85 % NaCl gewaschen (siehe 2.5.) und die Zellsedimente in neutralem P-Puffer resuspendiert (OD_{580} = 1,6). Die Bindung der Zellen wurde nach der in 2.7. beschriebenen Methode bestimmt.

Proteinase K, Trypsin:

Für die Vorbehandlung der Zellen mit Proteinase K bzw. mit Trypsin wurde 0,1 M P-Puffer, pH 7,0, verwendet, der 2 mM $MgCl_2$ enthielt. Die Reaktionsgemische bestanden aus jeweils 4 ml Bakteriensuspension und 1 ml Enzymlösung. Die Enzymlösung enthielt 100 Einheiten Proteinase K bzw. 400 (800) Einheiten Trypsin. Die Proteinase K-Ansätze wurden 1 h, die Trypsin-Ansätze 3 h bei 35°C in einem Schüttelwasserbad (Stufe 5) inkubiert.

α-Amylase, α 1,4 → α 1,6 Amyloglucosidase:

Die Vorbehandlung der Zellen mit α-Amylase bzw. mit α 1,4 → α 1,6 Amyloglucosidase erfolgte in 0,1 M Natriumazetatpuffer, pH 5,0. Die Reaktionsgemische bestanden aus jeweils 4 ml Bakteriensuspension und 1 ml Enzymlösung. Die Enzymlösung enthielt 200 Einheiten α-Amylase bzw. 100 Einheiten α 1,4 → α 1,6 Amyloglucosidase. Die Reaktionsansätze wurden 3 h bei 30°C im Schüttelwasserbad (Stufe 5) inkubiert.

Dextranase:

Für die Vorbehandlung der Zellen mit Dextranase wurde 0,1 M Sørensen-Phosphatpuffer, pH 6,0, verwendet. 4 ml Bakteriensuspension wurden mit 1 ml Enzymlösung vermischt, die 325 Einheiten Dextranase enthielt. Die Proben wurden 5 min bei 37°C im Schüttelwasserbad (Stufe 5) inkubiert.

Harnstoff:

Die durch Zentrifugation gewonnenen Zellsedimente wurden in 0,1 M P-Puffer, pH 7,0, resuspendiert, der 4 M Harnstoff enthielt, und 15 min bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (120 Upm) inkubiert.

Natriumperjodat:

Zu 2,5 ml einer Zellsuspension in 0,1 M P-Puffer, pH 7,0, wurden 2,5 ml 0,1 M P-Puffer, pH 7,0, mit 0,02 M Natriumperjodat gegeben und gut vermischt. Die sich daraus ergebende Suspension hatte einen Zelltiter von 6×10^9/ml. Der Ansatz wurde 15 min in ein Eisbad (ca. 2°C) gestellt.

EDTA:

A) Die Methode von Leive et al. (58) zur EDTA-Behandlung von E. coli wurde wie folgt modifiziert: 50 ml einer logarithmischen M9 Glc-Kultur von S. marcescens HY (Zelltiter = 6×10^8/ml) wurden in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (10 min, 5900 x g, Rotor SS34). Danach wurden die Zellsedimente in der 1/10 des ursprünglichen Volumens entsprechenden Menge 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, resuspendiert und 5 min in ein Eisbad gestellt. Nachdem die Zellsuspension 10 min auf 30°C vorgewärmt worden war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, der 0,2 M EDTA enthielt, gestartet. Die Bebrütung fand 2 min bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (120 Upm) statt. Um die Behandlung zu beenden, wurden dem Ansatz dann 50 µl 0,2 M $MgCl_2$ hinzugefügt.

B) Die durch Zentrifugation gewonnenen Zellsedimente wurden in 0,1 M P-Puffer, pH 7,0, resuspendiert, der 0,01 M EDTA enthielt. Der Ansatz wurde 15 min bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (120 Upm) inkubiert.

.13. Mutagenisierung von Bakterien

Die Mutagenisierung von S. marcescens HY wurde nach der Methode von Winkler et al. (91) durchgeführt.

10 ml NB-Medium wurden mit dem Stamm HY angeimpft und bis zu einem Titer von ca. 3×10^8 Zellen/ml bei 30°C bebrütet. Die logarithmische Kultur wurde dann 5 min in ein Eisbad gestellt und anschließend in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (10 min, 2442 x g, Rotor SS34). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5 ml P-Puf-

fer, pH 6,0, resuspendiert. Danach wurde 1 ml NG-Lösung (100 µg/ml in P-Puffer, pH 6,0) mit 1 ml Bakteriensuspension vermischt. Unmittelbar nach dem Zusammengeben (t = 0) wurde eine 0,5 ml Probe entnommen und sofort mit 0,1 M P-Puffer, pH 7,0, 10^{-5} und 10^{-6} verdünnt (Anfangstiter). Der Mutagenisierungsansatz wurde bei 30°C inkubiert. Nach 30 min Bebrütung (t = 30) wurde nochmals eine 0,5 ml Probe entnommen und mit P-Puffer verdünnt (10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}). Zu dem Rest des Ansatzes wurden 9 ml eiskaltes NB-Medium gegeben. Dieser wurde 10 min bei 2442 x g zentrifugiert und das Sediment in 10 ml NB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde in 3 Reagenzgläser à 3 ml aufgeteilt und bis zu einem Titer von 3 x 10^8 Zellen/ml bei 30°C bebrütet. Danach wurden die Kulturen mit P-Puffer, pH 7,0, verdünnt (2 x 10^{-5}). Von jeder Kultur wurden jeweils 10 NB-Agarplatten bespatelt (etwa 150 Kolonien/Platte) und 48 h bei 30°C bebrütet. Diese Platten wurden verwendet, um SDS-hypersensible Mutanten zu isolieren. Der Anteil der überlebenden Bakterien wurde aus den Keimtitern errechnet, die bei t = 0' und t = 30' bestimmt wurden (siehe 2.6.).

2.14. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die biologischen Präparate wurden in einem Siemens-Elmiskop 101 Elektronenmikroskop bei 80 kV untersucht und auf 6,5 x 9 cm Agfa ortho 25 professional Film aufgenommen.

Befilmung der Netze:

Die Kupfernetze (Typ 200/841/025, Veco GmbH) wurden nach der Vorschrift von Ruthmann (77) mit einer Formvar-Lösung (0,3 % [w/v] Polyvinylformal in Chloroform) befilmt.

Vorbereitung der biologischen Präparate:

10 ml M9 Glc-Medium wurden mit Zellen der zu untersuchenden Bakterienstämme beimpft und 12 h bei 30°C gerollt. Die Kulturen wurden in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (15 min, 2442 x g, Rotor SS34) und die Bakteriensedimente in 5 ml einer aus 0,2 %igem Paraformaldehyd und 2 %igem

Glutaraldehyd bestehenden Lösung resuspendiert (Zelltiter = 1×10^8/ml). Die Zellsuspension wurde 1 h bei 4°C fixiert und dann mit 10 mM P-Puffer, pH 7,0, gewaschen (siehe 2.5.). Danach wurden die Bakteriensedimente in dem gleichen Puffer resuspendiert (Zelltiter = 1×10^7/ml).

Je 3 µl der zu untersuchenden Bakteriensuspension wurden auf mit Formvar-Film beschichtete Objektträgernetze aufgetragen und 15 min bei ZT belassen. Die überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig mit Filterpapier entfernt. Die Objektträgernetze wurden 30 sec in 95 %igem Ethanol entwässert, an der Luft getrocknet und anschließend unter einem Winkel von 9° einer Bedampfung mit Platin-Palladium-Draht ausgesetzt (Hochvakuum-Bedampfungsanlage BAE 080, Balzers Union).

15. Isolierung und Reinigung von Fimbrien

15.1. Gewinnung des Rohmaterials

Bakterienanzucht:

3 x 2 l M9 Glc-Medium in 5 l Erlenmeyerkolben wurden mit je 2 M9 Glc-O-Kulturen à 10 ml von S. marcescens HY bzw. Stamm K28 inokuliert. Der Anfangstiter betrug ca. 6×10^7 Zellen/ml. Die Bebrütung erfolgte 22-24 h bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (120 Upm).

Waschen der Kulturen:

Die Kulturen (ca. 6 l) wurden zweimal mit jeweils 3 l 0,85 % NaCl gewaschen. Dies erfolgte durch Zentrifugation in einer Sorvall-Zentrifuge (20 min, 6117 x g, Rotor GS3) und Resuspension der gewonnenen Zellsedimente in der Salzlösung.

Waring blendor Behandlung:

Bakteriensuspensionen in 0,1 M P-Puffer, pH 7,0, mit einem Volumen von 260 ml wurden auf 4°C abgekühlt und in einem Waring blendor zweimal für jeweils 2,5 min bei maximaler Upm gemischt.

Gewinnung des Überstandes:

Die behandelten Kulturen wurden dreimal in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (20 min, 15000 x g, Rotor SS34).

Ammoniumsulfat-Fällung:

Nach Abkühlung des Überstandes auf ca. 0°C erfolgte die Zugabe von festem Ammoniumsulfat, bis ein 50 %iger Sättigungsgrad erreicht war (29,1 g/100 ml). Die erforderliche Menge Ammoniumsulfat wurde dem Nomogramm von Dixon entnommen (62).

Gewinnung des Präzipitates:

Der Überstand wurde 24 h bei 4°C belassen und dann in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (1 h, 27000 x g, Rotor SS 34).

Dialyse:

Das Präzipitat wurde in 7,5 ml P-Puffer gelöst und 72 h gegen insgesamt 9 l P-Puffer dialysiert.

2.15.2. Gelchromatographie

Säulenfüllung: Bio Gel A50m

Trennmedium: 0,1 M P-Puffer, pH 7,0

Säulencharakteristika: Innendurchmesser = 1,7 cm, Füllhöhe = 86 cm, Volumen = 195,2 ml

Durchflußgeschwindigkeit: ca. 14,6 ml/h

Ausschlußvolumen: 38,7 ml (mit Blue Dextran 2000 bestimmt)

Fraktionen: 100 à 2,15 ml

Probevolumen: 4,5 ml Rohmaterial; Proteingehalt: 4,1 mg

2.15.3. Gelelektrophorese

Es wurde bei ZT nach einer Vorschrift von Weber und Osborn verfahren, die bei Frost und Paranchych beschrieben ist (34).

Das Gel enthielt 12,5 % Acrylamid, 0,34 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,07 % Ammoniumpersulfat, 0,02 % N,N,N',N'-Tetramethylendiamin und 0,1 % SDS in 0,5 M Natriumphosphatpuffer.

Die Protein-Denaturierung erfolgte in einem Gesamtvo-

lumen von 100 µl mit 50 µl Protein, 2,0 % SDS und 0,2 % Dithiothreitol. Der Ansatz wurde 5 min bei 100°C inkubiert. Die Probe enthielt 50 µl denaturierte Proteinlösung und 50 µl 0,005 % (w/v) Bromophenol in 60 %igem Glycerin.

Als Laufpuffer wurde 0,05 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, mit 0,1 % (w/v) SDS verwendet. Stromstärke = 22 mA.

Die Gele wurden folgendermaßen gefärbt: 24 h in Lösung 1 (10 % Isopropanol, 10 % Essigsäure und 0,005 % [w/v] Coomassie Brilliant Blue) und 24 h in Lösung 2 (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure und 0,005 % [w/v] Coomassie Brilliant Blue). Sie wurden in 10 %iger Essigsäure entfärbt.

.16. Chemische Bestimmungsmethoden

.16.1. Kohlenhydrat

Kohlenhydratkonzentrationen wurden nach der Methode von Dubois et al. (18) bestimmt.

Reagenzien: A = 5 %iges (w/v) Phenol
B = 95-97 %ige H_2SO_4

Je 0,5 ml der Proben wurden mit 0,5 ml von Reagenz A und 2,5 ml von Reagenz B versetzt und kräftig gemischt. Nachdem alle Proben derart behandelt worden waren, wurden sie zunächst für 10 min bei 90°C und danach für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden sie noch 10 min bei ZT belassen. Die Extinktion (OD_{490}) der Proben wurde gegen die der Kontrolle gemessen, die A. dest. bzw. P-Puffer anstelle der kohlenhydrathaltigen Lösung enthielt. Als Standard diente Dextran T70 (MG ca. 70 x 10^3). Der Test eignete sich für den Konzentrationsbereich 10-100 µg/ml.

.16.2. 2-Keto-3-Desoxyoktulonat (KDO)

Methode nach Karkhanis et al. (52).

Reagenzien: A = 0,4 N H_2SO_4
B = 0,4 M HIO_4 in 0,125 N H_2SO_4
C = 2,6 % $NaAsO_2$ in 0,5 N HCl
D = 0,6 %ige Thiobarbitursäure
E = Dimethylsulfoxid (DMSO)

Gleiche Volumina der Probelösung bzw. des P-Puffers (Kontrolle) und des Reagenzes A wurden vermischt und 30 min bei 100°C gehalten. Trat nach der Inkubation ein Niederschlag auf, wurden die Proben 10 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, maximale Upm). Nach Abkühlung auf ZT wurden 0,5 ml dieser Lösung in ein sauberes Reagenzglas pipettiert, mit 0,25 ml von Reagenz B versetzt und kräftig geschüttelt. Nachdem das Gemisch 20 min bei ZT stehengelassen worden war, erfolgte die Zugabe von 0,25 ml von Reagenz C. Die Ansätze wurden wiederum stehengelassen, bis die entstandene braune Farbe verschwunden war. Nach Hinzufügung von 0,5 ml von Reagenz D wurden die Proben 15 min bei 100°C inkubiert. Zu den noch heißen Ansätzen gab man 1 ml von Reagenz E und ließ die Proben abkühlen. Die Extinktion (OD_{548}) der Proben wurde dann gegen die der Kontrolle gemessen. Als Standard diente eine KDO-Lösung. Der Test eignete sich für den Konzentrationsbereich 1-12 µg/ml.

2.16.3. Protein

A) Methode nach Lowry et al. (59).

Reagenzien: A = 2 % $NaCO_3$ in 0,1 NaOH
B = 2 % K,Na-Tartrat in A. dest.
C = 1 % $CuSO_4$ in A. dest.
D = Unmittelbar vor Gebrauch wurden 50 ml von Reagenz A und je 0,5 ml der Reagenzien B und C vermischt.
E = Folin-Ciocalteus (Merck, Darmstadt)

Test:

	Probe	Kontrolle
A. dest.	0,3 ml	0,4 ml
Proteinlösung	0,1 ml	-
Reagenz D	1,0 ml	1,0 ml

Nach Vermischen der Lösungen wurden die Reagenzgläser mit den Proben 10 min bei ZT stehengelassen. Danach erfolgte unter kräftigem Rühren die Zugabe von 0,1 ml von Reagenz E. Die Ansätze wurden 30 min bei ZT belassen. Die Extinktion (OD_{750}) der Proben wurde gegen die der Kontrolle gemessen. Als Standard diente eine Rinderserumalbumin-Lösung. Der Test eignete sich für den Konzentrationsbereich 10-500 µg/ml.

B) Methode nach Bradford (06).

Reagenz: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 wurden in 50 ml 95 %igem Ethanol gelöst. Zu der Lösung wurden 100 ml 85 %ige Phosphorsäure gegeben. Das Reagenz wurde dann mit A. dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Zu 0,1 ml Probelösung wurden 5 ml Reagenz gegeben und vermischt. Nach 15 min wurde die Extinktion (OD_{595}) der Proben gegen die der Kontrolle gemessen, die anstelle der Probelösung 0,1 ml P-Puffer, pH 7,0, enthielt. Als Standard diente eine Rinderserumalbumin-Lösung. Der Test eignete sich für den Konzentrationsbereich 100-1000 µg/ml.

.16.4. Reduzierende Zucker

Methode nach Nelson und Somogyi (85).

Reagenzien:

A = Alkalisches Kupfer-Reagenz. 14 g Na_2HPO_4 und 20 g K,Na-Tartrat wurden in 350 ml A. dest. gelöst. Nach Zugabe von 50 ml 1 N NaOH wurden 40 ml einer 10 %igen $CuSO_4 \cdot 5H_2O$-Lösung unter Rühren hinzugefügt. Anschließend wurden 90 g Na_2SO_4 zugegeben und gelöst. Das Reagenz wurde dann mit A. dest. auf 500 ml aufgefüllt.

B = Arsenmolybdat-Reagenz. 25 g Ammoniummolybdat wurden in 450 ml A. dest. gelöst und 21 ml H_2SO_4 (95-97 %) unter Rühren dazugegeben. Danach wurden 3 g in 25 ml A. dest. gelöstes $NaHAsO_4 \cdot 7H_2O$ mit der Molybdat-Lösung vermischt. Die Lösung wurde 24-48 h bei 37°C inkubiert und danach in einer braunen Flasche aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurde die Lösung mit 1,5 N H_2SO_4 1:3 verdünnt.

Je 1 ml der zu testenden Zuckerlösungen wurden mit 1 ml von Reagenz A vermischt und 10 min bei 100°C inkubiert. Nach Abkühlung der Proben in einem Leitungswasserbad wurde 1 ml von Reagenz B hinzugefügt und sofort vermischt. Die Ansätze wurden dann mit 3 ml A. dest. verdünnt. Als Kontrollen dienten Parallelansätze, die anstelle der Zuckerlösung 1 ml A. dest. bzw. P-Puffer, pH 7,0, enthielten. Die Extinktion (OD_{520}) der Proben wurde gegen die der Kontrollen gemessen. Als Standard fand eine Lösung von Glucose-Monohydrat Verwen-

dung. Der Test eignete sich für den Konzentrationsbereich 10-100 µg/ml.

2.17. Enzymatische Bestimmungsmethoden

2.17.1. Lipase

Methode nach Thöner (87); vgl. auch Winkler und Stuckmann (92).

Substrat: A = 207 mg Natriumdesoxycholat und 100 mg Gummi arabicum wurden in 90 ml 0,05 M P-Puffer, pH 8,0, gelöst.

B = 30 mg p-Nitrophenylpalmitat (pNPP) wurden in 10 ml Isopropanol bei 50°C gelöst.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen A und B miteinander vermischt.

Test:

	Probe	Kontrolle
Substrat	2,4 ml	2,4 ml
Überstand	0,1 ml	-
0,05 M P-Puffer, pH 8,0	-	0,1 ml

Die Substratlösung wurde zunächst 5 min bei 37°C vorgewärmt. Dann wurde 0,1 ml Kulturüberstand bzw. Puffer hinzugefügt und beides vermischt. Nach genau 15 min Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion (OD_{410}) der Probe gegen die der Kontrolle gemessen. Eine Enzymeinheit (EU) entspricht 1 µmol von Nitrophenol, das innerhalb 1 min unter den standardisierten Bedingungen enzymatisch aus pNPP freigesetzt wird.

2.17.2. Nuclease

Methode nach Eaves und Jeffries (21).

Substrat: 1 %ige RNA-Lösung. Die niedermolekulare RNA aus Hefe wurde wie bei Frisch et al. beschrieben gereinigt (33).

Test:

	Probe	Kontrolle
0,4 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,8	0,25 ml	0,25 ml
1 %ige RNA-Lösung	0,50 ml	0,50 ml
0,75 % Uranylazetat in 25 %iger Perchlorsäure	-	0,25 ml
Kulturüberstand	0,25 ml	0,25 ml

Die auf 30°C vorgewärmten Lösungen wurden in den oben aufgeführten Mengen zusammengegeben. Nach 15 min Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,25 ml 0,75 % Uranylazetat in 25 %iger Perchlorsäure gestoppt. Alle Ansätze wurden 10 min in einem Eisbad belassen. Danach wurden sie 15 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, maximale Upm). 0,1 ml des Überstandes wurde mit 3 ml A. dest. verdünnt. Die Extinktion (OD_{260}) der Probe wurde gegen die der Kontrolle gemessen. Eine Enzymeinheit (EU) wird unter den o.g. Bedingungen als $\triangle OD_{260} = 1{,}0\ min^{-1}$ definiert.

2.17.3. Protease

Methode nach Charney und Tomarelli (10).

Substrat: 1,25 g Azocasein wurden in 0,1 M P-Puffer, pH 7,6, bei 50°C gelöst.

Test:

	Probe	Kontrolle
Substrat	1,0 ml	1,0 ml
Kulturüberstand	0,5 ml	-

Die auf 30°C vorgewärmten Lösungen wurden in den oben aufgeführten Mengen zusammengegeben und 30 min bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze mit 1 ml einer eiskalten 10 %igen TCA-Lösung vermischt. Die Kontrolle wurde nach Zugabe der TCA-Lösung mit 0,5 ml der zu testenden Lösung versetzt. Alle Ansätze wurden 5 min bei ZT belassen und danach 10 min zentrifugiert (Tischzentrifuge, maximale Upm). 1 ml des Überstandes wurde mit 1 ml 0,5 N NaOH vermischt. Die Extinktion (OD_{440}) der Probe wurde gegen die der Kontrolle gemessen. Eine Enzymeinheit (EU) wird unter den o.g. Bedingungen als $\triangle OD_{440} = 1{,}0\ min^{-1}$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1. Die Bindung von S. marcescens HY an Sephadex

3.1.1. Dextran als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle für die Bakterien

Einige Bakterien sind fähig, an bestimmte partikuläre Substrate zu adhärieren und sie zu metabolisieren. Aus diesem Grund wurde zunächst festgestellt, ob S. marcescens HY Dextran als einzige Energie- oder C-Quelle zu nutzen vermag.

10 ml M9 Glc-Obernachtkultur von S. marcescens HY wurden in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (10 min, 5900 x g, Rotor SS34). Das so gewonnene Sediment wurde in 10 ml M9 Medium ohne C-Quelle resuspendiert. Um eventuell vorhandene Reservestoffe abzubauen, wurde die Suspension 3 h bei 30°C gerollt (Hungerung). Jeweils 10 ml M9 Medium ohne C-Quelle, M9 Glc-Medium und M9 Medium, das anstatt Glc 0,4 % Dextran T70 (MG ca. 70 x 10^3) enthielt, wurden mit den hungernden Bakterien so beimpft, daß sich ein Anfangstiter von ca. 2 x 10^7 Zellen/ml ergab. In Vorversuchen stellte sich heraus, daß die Zellen des Dextranansatzes agglutinierten, wenn die Proben auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm inkubiert wurden. Die Keimtiterbestimmung war dadurch starken Schwankungen unterworfen. Dieser Effekt konnte durch eine Inkubation im Rollapparat bei 33 Upm vermieden werden. Möglicherweise begünstigt die starke Schüttelbewegung die Interaktion zwischen den Zellen und den Dextranmolekülen. Die Ansätze wurden bei 30°C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten (0, 24, 48, 60, 72 h) wurden Proben zur Bestimmung des Keimtiters entnommen.

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß das Zellwachstum im Glc-Ansatz (positive Kontrolle), wie zu erwarten, normal vonstatten ging und nach 48 h einen Maximalwert von 5,36 x 10^9 Zellen/ml erreichte. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei dem Dextranansatz nach 24 h Bebrütung nur eine leichte Zunahme des Keimtiters. Dieser Titer blieb innerhalb 48 h konstant und nahm danach fortwährend ab. Da in dem Ansatz ohne C-Quelle (negative Kontrolle) kein Zellwachstum statt-

C-Quelle	Keimtiter (nach verschieden langer Bebrütungsdauer)				
	t = 0 h	24 h	48 h	60 h	72 h
Dextran	$1{,}85 \times 10^7$ (1,0)	$3{,}51 \times 10^7$ (1,90)	$3{,}44 \times 10^7$ (1,86)	$1{,}71 \times 10^7$ (0,92)	$1{,}54 \times 10^7$ (0,83)
Glucose (positive Kontrolle)	$2{,}11 \times 10^7$ (1,0)	$5{,}32 \times 10^9$ (252)	$5{,}36 \times 10^9$ (254)	$4{,}94 \times 10^9$ (234)	$3{,}21 \times 10^9$ (152)
keine (negative Kontrolle)	$2{,}01 \times 10^7$ (1,0)	$1{,}52 \times 10^7$ (0,76)	$1{,}61 \times 10^7$ (0,80)	$8{,}0 \times 10^6$ (0,40)	$6{,}21 \times 10^6$ (0,31)

Tab. 3: Wuchsverhalten von S. marcescens HY in M9 Medium mit Dextran (0,4 %) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle.

Die Werte in Klammern sind Wachstumsfaktoren, bezogen auf den jeweiligen Keimtiter bei t = 0 h.

fand und da für das Experiment kein dialysiertes Dextran verwendet wurde, könnte das geringe Wachstum der Zellen auf Dextran auf Verunreinigungen des Polysaccharides mit niedermolekularen Bausteinen, wie z.B. Glucose zurückzuführen sein.

Anbetracht dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, daß Dextran T70 eine Energie- oder C-Quelle für S. marcescens HY darstellt.

3.1.2. Abhängigkeit der Zellbindung

3.1.2.1. von der Bakterienkonzentration

Um den Effekt der Bakterienkonzentration auf die Anzahl gebundener Zellen zu untersuchen, wurde eine Bakteriensuspension in neutralem P-Puffer so verdünnt, daß eine Reihe von Konzentrationen zwischen $3{,}2 \times 10^8$ und $1{,}09 \times 10^{10}$ Zellen/ml entstand. Dazu fand eine M9 Glc-Übernachtkultur Verwendung, die vor dem Versuch zweimal mit P-Puffer gewaschen worden war.

Die verschieden stark konzentrierten Zellsuspensionen wurden dann im Bindetest eingesetzt. Dabei wurden sie noch 1:2 verdünnt. Die Sephadexkonzentration blieb bei allen Ansätzen konstant. Sie betrug 45 mg/ml. Am Ende der Inkubationszeit (30 min) wurde die Anzahl der Bakterien in den Überständen (freie oder nicht gebundene Zellen) und in den entsprechenden Sephadex-freien Kontrollen mikroskopisch bestimmt (Neubauer-Zählkammer). In Abb. 2a, Kurve A, wurde die Anzahl gebundener Zellen pro 45 mg Sephadex (q) gegen die Anzahl der jeweils in den verschiedenen Versuchsansätzen vorhandenen Zellen (N) aufgetragen. Die Kurve hat einen typischen Sättigungsverlauf, d.h. bei hohen N-Werten wurden die meisten der hypothetischen Zellbindestellen auf den Oberflächen aller im Versuchsansatz befindlichen Sephadexpartikel besetzt. Kurve B von Abb. 2a zeigt, daß mit zunehmenden N-Werten der relative (prozentuale) Anteil gebundener Zellen exponentiell abnahm.

Die von Langmuir abgeleitete Adsorptionsisotherme beschreibt für viele physikalisch-chemische Vorgänge die Ad-

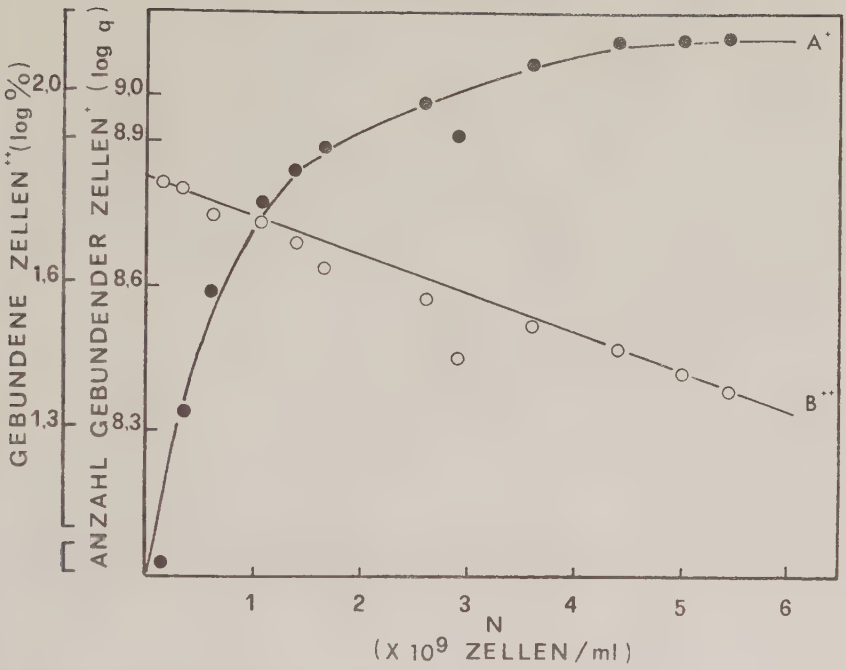

Abb. 2 : Abhängigkeit der Zellbindung von S. marcescens HY von der Konzentration der zum Bindetest eingesetzten Zellsuspensionen (N).

2a: Halblogarithmische Auftragung der Anzahl gebundener Zellen (Kurve A) und der prozentualen Häufigkeit der gebundenen Zellen (Kurve B) gegen den Gesamtzelltiter in den verschiedenen Versuchsansätzen.

sorption eines Liganden an eine Grenzfläche. Die Langmuirsche Gleichung setzt voraus, daß die adsorbierte Substanz (Gas) an der festen Oberfläche eine monomolekulare Schicht bildet, daß die Oberfläche der Trägersubstanz homogen ist und eine bestimmte Anzahl von Bindestellen besitzt, an denen nur jeweils ein Gasmolekül gebunden wird, und daß sich bei der Adsorption nach einer bestimmten Zeit ein von den entsprechenden Versuchsbedingungen abhängiges Gleichgewicht einstellt, in dem die Anzahl der durch Adsorption festgehaltenen Moleküle genauso groß ist, wie die Anzahl der gleichzeitig wieder freigesetzten (07,54).

Eine Linearisierung der Langmuirschen Isotherme lautet:[a]

$$\frac{p}{y} = \frac{p}{y_{max}} + \frac{1}{by_{max}}$$

Darin bedeutet: p = Partialdruck des Gases im Gleichgewichtszustand; y = adsorbierte Gasmenge; y_{max} = größtmögliche Gasmenge, die gebunden werden kann; b = Gleichgewichtskonstante (Ka/Kd).

---

[a] Die Geschwindigkeit der Adsorption von Gasmolekülen an eine Oberfläche ist proportional der Anzahl freier Gasmoleküle (Partialdruck = p) und den noch verfügbaren, d.h. freien Oberflächenstellen (1 - Θ), so daß:

$$\text{Adsorptionsgeschwindigkeit} = Ka\ (1 - \Theta)\ p \qquad 1)$$

Andererseits ist die Gasmolekül-Desorptionsgeschwindigkeit proportional der Anzahl adsorbierter Gasmoleküle (y) und dem besetzten Oberflächenteil (Θ):

$$\text{Desorptionsgeschwindigkeit} = Kd\ \Theta \qquad 2)$$

Ka bzw. Kd sind die Adsorptions- und Desorptionskonstanten.

Im Gleichgewichtszustand gilt demnach die Gleichung:

$$Ka\ (1 - \Theta)\ p = Kd\ \Theta \qquad 3)$$

Durch Umformung erhält man:

$$\Theta = \frac{Ka\ p}{Kd + Ka\ p} = \frac{\frac{Ka}{Kd}\ p}{\frac{Kd}{Kd} + \frac{Ka}{Kd}\ p} = \frac{\frac{Ka}{Kd}\ p}{1 + \frac{Ka}{Kd}\ p} \qquad 4)$$

Durch Einführung der Gleichgewichtskonstanten b für das Verhältnis Ka/Kd ergibt sich:

$$\Theta = \frac{bp}{1 + bp} \qquad 5)$$

Um zu prüfen, ob die Adhäsion von S. marcescens HY-Zellen an Sephadex der Langmuirschen Isotherme folgt, wurden die Resultate des Bindeversuches von Abb. 2a, Kurve A, in die vorher genannte Gleichung wie folgt eingesetzt:

Der Wert p gibt in diesem Fall die Anzahl der freien Zellen im Gleichgewichtszustand (f) wieder, während die adsorbierte Gasmenge (y) sich durch die experimentell festgestellte Anzahl gebundener Zellen (q) bei einer bestimmten Zellkonzentration (N) ersetzen läßt. Dann ist q_{max} die Anzahl gebundener Zellen bei vollständiger Belegung des Trägers. Das Verhältnis Ka/Kd entspricht der Gleichgewichtskonstanten b der Zellbindung. Trägt man daher f/q gegen f in einem Diagramm auf, schmiegen sich die Meßpunkte an eine Gerade an (Abb. 2b), das bedeutet, daß die Zellbindung an Sephadex tatsächlich einen Langmuirschen Verlauf aufweist. Die Steigung der Geraden entspricht $1/q_{max}$ und der Ordinatenabschnitt $1/(b\ q_{max})$.

Aus Abb. 2b wurden folgende Werte entnommen:
$q_{max} = 1{,}6 \times 10^9$ gebundene Zellen/45 mg Sephadex,
d.h. $3{,}5 \times 10^7$ Zellen/mg Sephadex.
$b = 1 \times 10^{-9}$

Die Tatsache, daß die Zellbindung an Sephadex G25 fine der Langmuirschen Isotherme folgt, bedeutet aber noch nicht sehr viel, und die o.g. Werte bleiben eine halbempirische Näherung, da die Bindung von Zellen aus Lösungen theoretisch

---

y stellt die experimentell ermittelte Anzahl adsorbierter Gasmoleküle dar und y_{max} die größtmögliche Anzahl an Gasmolekülen, die unter definierten Versuchsbedingungen an eine bestimmte Menge fester Substanz festgehalten wird. Somit ist:

$$\Theta = \frac{y}{y_{max}} \qquad 6)$$

Durch Ersetzen von Θ durch y/y_{max} in Gleichung 5) erhält man:

$$\frac{y}{y_{max}} = \frac{bp}{1 + bp} \quad \text{oder} \quad y = \frac{y_{max}\ bp}{1 + bp} \qquad 7)$$

Die Umformung von Gleichung 7) führt schließlich zu der auf S. 34 angegebenen Linearisierung der Langmuirschen Isotherme.

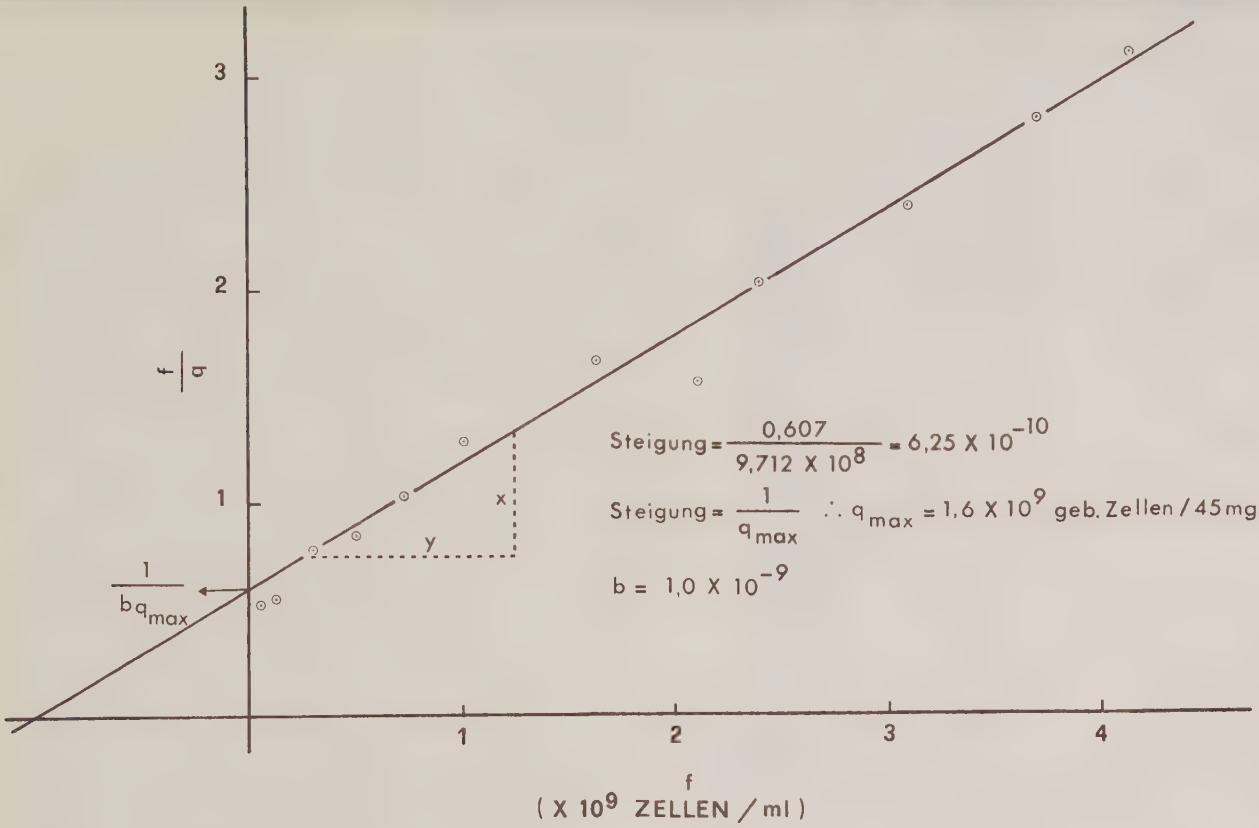

Abb. 2b: Langmuirsches Diagramm für die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine bei 30°C; die Daten hierzu stammen aus Abb. 2a, Kurve A.

f = Anzahl freier Zellen, q = Anzahl gebundener Zellen.

viel schwieriger zu behandeln ist, als die Adsorption von Molekülen aus der Gasphase, u.a. deshalb, weil außer der Zellkonzentration auch andere biologische und physikalische Faktoren, wie z.B. die Wachstumsphase der Bakterien oder die Ionenstärke und der pH-Wert des Mediums, eine wichtige Rolle spielen können. Eine besondere Einschränkung der Isotherme bedeutet die Voraussetzung, daß im Sättigungszustand ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Adsorption und Desorption von Molekülen bestehen muß, was bei der Bindung von Bakterien an Oberflächen nicht sehr wahrscheinlich ist.

In Abb. 2c wurden die Versuchsergebnisse nach der Michaelis-Menten Gleichung aufgetragen, so daß man die Anzahl der hypothetischen Bindestellen auf der Oberfläche aller Sephadexpartikel pro Versuchsansatz indirekt abschätzen kann. Die Anwendung der Michaelis-Menten Kinetik auf die hier vorliegende Situation erfolgt ebenfalls nur unter Vorbehalten, insbesondere deshalb, weil q nicht wie allgemein üblich eine Anfangsreaktionsrate (z.B. µmole/liter.min) wiedergibt, sondern einen unter den gegebenen Bedingungen erreichten Zustand (gebundene Zellen/45 mg Sephadex).

Folgende formale Werte lassen sich aus Abb. 2c ablesen:
q_{max} = 2,1 x 10^9 gebundene Zellen/45 mg Sephadex,
d.h. 4,7 x 10^7 Zellen/mg Sephadex.
K_m = 2,85 x 10^9 Zellen/ml
Der Wert q_{max} gibt die Anzahl der Bakterien an, die unter den gewählten Versuchsbedingungen maximal an 45 mg (bzw. standardisiert auf 1 mg) Sephadex gebunden werden kann. Der Wert K_m gibt die Bakterienkonzentration (N) an, bei der unter den gewählten Versuchsbedingungen 50 % der hypothetischen Zellbindestellen an den Sephadexpartikeln besetzt sind, vorausgesetzt, daß jede Zelle über nur eine Bindestelle an den Sephadexpartikeln festgehalten wird.

In den nachfolgenden Experimenten wurde für den Bindetest (siehe 2.7.) eine Zellkonzentration von 2 x 10^9 Zellen/ml als Standardwert gewählt, da bei dieser Konzentration ein großer Teil der eingesetzten Bakterien an die Sephadexpartikel bindet (im Durchschnitt 40 - 50 %), eine Sättigung

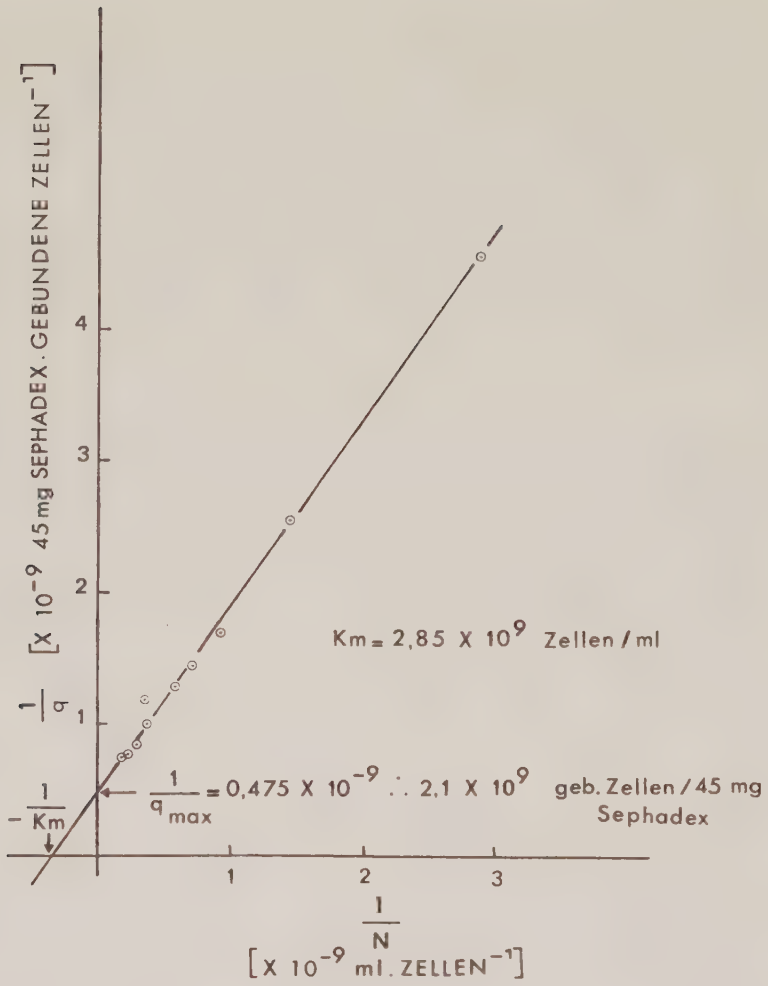

Abb. 2c: Doppelt-reziproke Darstellung (Lineweaver-Burk) der Ergebnisse von Abb. 2a, Kurve A, analog einer Enzym-Reaktionskinetik.

der vorhandenen Oberfläche aber noch nicht erreicht ist. Dieser Umstand erlaubt die Untersuchung von Substanzen, die die Zellbindung eventuell hemmen oder stimulieren können. Außerdem entspricht diese Konzentration einem Extinktionswert (OD_{580}) von ca. 0,8, ein Wert, der photometrisch bestimmt werden kann, ohne daß die Proben verdünnt werden müßten. Dadurch wird eine mögliche Fehlerquelle in den Meßwerten ausgeschlossen.

Die sphärischen Sephadex G25 fine-Partikel weisen in trockenem Zustand einen Durchmesser von 20 - 80 µm auf. (Angaben des Herstellers Pharmacia). Um den mittleren Durchmesser der Fraktion in feuchtem Zustand zu ermitteln, wurden 300 in P-Puffer gequollene Partikel in einem Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe eines Okularmikrometers (10 x) gemessen. Vor den Messungen wurde das Okularmikrometer mit einem Objektmikrometer auf das Phakoobjektiv Ph1 (10 x) geeicht. Der mittlere Durchmesser der Sephadexpartikel betrug 89,3 µm. Nach den Formeln $S = 4\pi r^2$ und $V = 4/3\pi r^3$ (r = Radius der Partikel) wurden folgende Werte für die Oberfläche (S) bzw. das Volumen (V) eines Partikels berechnet:

$$S_p = 2{,}5 \times 10^{-4}\ cm^2$$

$$V_p = 3{,}7 \times 10^{-7}\ cm^3$$

1 g Sephadex wurde in P-Puffer suspendiert und ca. 14 h bei ZT belassen. Danach wurde es in eine fein graduierte 5 ml Spritze gegeben. Das Bettvolumen des Gels (V_T) betrug 4,27 cm^3. Mit einer 0,2 %igen Blue Dextran-Lösung wurde dann das Ausschlußvolumen des Gels (V_O) bestimmt. Aus drei voneinander unabhängigen Messungen ergab sich ein Mittelwert von 1,207 $\pm$ 0,033 cm^3. Das Volumen aller in 1 g enthaltenen Partikel (V_{PT}) ließ sich durch Subtrahieren des Ausschlußvolumens vom Bettvolumen des Gels berechnen:

$$V_{PT} = V_T - V_O = 3{,}06\ cm^3$$

Der Quotient aus dem Volumen aller in 1 g enthaltenen Partikel (V_{PT}) und dem Volumen eines Partikels entsprach der Gesamtpartikelanzahl in 1 g Sephadex:

$$\frac{V_{PT}}{V_P} = \frac{3{,}06\ cm^3}{3{,}7 \times 10^{-7}\ cm^3} = 8{,}27 \times 10^6 \text{ Partikel/g Sephadex}$$

d.h. $3{,}72 \times 10^5$ Partikel/45 mg Sephadex
Daraus ergibt sich eine Gesamtoberfläche von ca. 93,2 cm^2 für 45 mg Trägersubstanz.

Nach der Adsorptionsisotherme von Langmuir sollten bei einer maximalen Zellbelegung von 45 mg Sephadex etwa $1{,}6 \times 10^9$ Zellen gebunden sein. Anbetracht der o.g. Anzahl an Sephadexpartikeln müßten sich $4{,}3 \times 10^3$ gebundene Zellen auf einem Partikel oder 1 Bakterium ca. alle 5,8 μm^2 Sephadexoberfläche befinden, vorausgesetzt, daß die Sephadexoberfläche homogen ist und die gebundenen Zellen gleichmäßig verteilt sind.

Bei Verwendung einer Zellkonzentration von 2×10^9 Bakterien/ml binden unter standardisierten Bedingungen (siehe 2.7.) im Durchschnitt etwa 1×10^9 Zellen an 45 mg Sephadex. Dieser Wert entspricht etwa $2{,}69 \times 10^3$ gebundenen Zellen pro Partikel bzw. 1 gebundenen Zelle ca. alle 9,3 μm^2.

Die errechneten Mittelwerte sind nur Näherungen, da sie u.a. die Größe der Poren auf der Oberfläche der Sephadexpartikel nicht berücksichtigen. Sehr wahrscheinlich sind die Poren dieses Sephadex-Materials aber so klein, daß die Bakterien nicht in sie hineingelangen können.

3.1.2.2. von der Sephadex G25 Partikeloberfläche

In dem vorangegangenen Versuch wurde festgestellt, daß die anfängliche Zellkonzentration (N) den Umfang der Zellbindung an Sephadex G25 fine bedingt. Die Bindekapazität eines gegebenen Trägers, ausgedrückt durch die Anzahl gebundener Zellen pro Gewichtseinheit, kann aber auch in Abhängigkeit von der Größe der Partikel variieren, aus denen der Träger zusammengesetzt ist. Deshalb sollte die Bindung von S. marcescens HY an Sephadexfraktionen unterschiedlicher mittlerer Partikelgröße untersucht werden.

Für diese Experimente ist die Sephadex G25 Serie besonders gut geeignet, da sie sich aus verschiedenen Siebfraktionen zusammensetzt, die einen breiten Partikelgrößebereich

umfassen. Die Partikel innerhalb einer Fraktion weisen jedoch relativ große Unterschiede hinsichtlich ihres Durchmessers auf. Um Fraktionen mit einem engen Partikelgrößebereich zu erhalten, wurden die verschiedenen Sephadex G25-Typen einem Siebverfahren unterzogen.

Sephadex G25 coarse (ø = 100 - 300 µm), medium (ø = 50 - 150 µm) und superfine (ø = 10 - 40 µm) wurden nach dem im Abschnitt 2.9. beschriebenen Verfahren gesiebt. Dadurch entstanden von jedem Sephadextyp zwei Siebfraktionen. Von diesen Fraktionen wurden jeweils ca. 300 Partikel in einem Mikroskop gemessen, das mit einem Okularmikrometer (10 x) ausgestattet war. Zur Eichung des Okularmikrometers auf das Phakoobjektiv Ph1 (10 x) wurde ein Objektmikrometer verwendet. Abhängig von der Größe der Partikel und der Häufigkeitsverteilung der Durchmesser wurde entweder die auf der Oberfläche des Siebgewebes verbliebene oder die durchgesiebte Sephadexfraktion für die weiteren Versuche ausgewählt.

Abb. 3 zeigt die Häufigkeitsverteilung verschiedener Partikelgrößen in den drei Fraktionen, die aus den Typen superfine (A), medium (B) und coarse (C) gewonnen wurden. Der mittlere Partikeldurchmesser betrug 20,3 µm, 108,3 µm bzw. 258,7 µm.

Für die Bestimmung der Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadexfraktionen unterschiedlicher Partikelgrößen wurden verschiedene Konzentrationen der gesiebten Sephadex G25-Fraktionen A, B und C sowie stationäre M9 Glc-Kulturen verwendet.

Der Bindetest wurde anstatt im Rollapparat im Rotationsschüttler, Stufe 6, bei 30°C durchgeführt. Die Schüttelbedingungen sicherten eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Partikel in den Ansätzen während des Tests. Da die Partikel verschiedener Größe ein unterschiedliches Absetzverhalten hätten aufweisen können, wurden die Ansätze nach 30 min Inkubation durch ein Nylongewebe (Maschenöffnung = 5 µm) gegeben, um genauere Ergebnisse zu erzielen. Die Sephadexpartikel mit den daran haftenden Bakterien wurden im Sieb zurückgehalten. Durch Bestimmung der Extinktion (OD_{580})

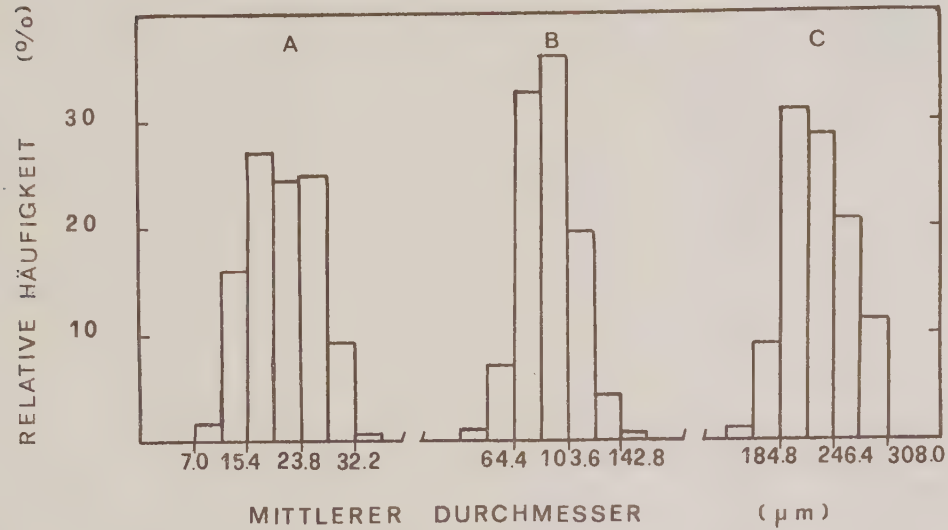

Abb. 3: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der Durchmesser von drei Sephadex G25 Fraktionen, die durch Sieben der Typen superfine (A), medium (B) und coarse (C) gewonnen wurden.

Die Sephadexpartikel wurden in trockenem Zustand mikroskopisch gemessen. Um repräsentative Meßergebnisse zu erzielen, wurden von jeder Fraktion drei Proben aus einer konstant gerührten Partikelpopulation entnommen. Anzahl vermessener Sephadex G25-Partikel: superfine = 318, medium = 300, coarse = 302.

des Filtrates konnte der Anteil freier Zellen bestimmt werden.

Abb. 4 zeigt, daß bei konstanter Bakterienkonzentration und variabler Sephadexkonzentration der Anteil ungebundener (freier) Zellen mit zunehmender Sephadexmenge exponentiell abnahm. Außerdem stellte sich erwartungsgemäß heraus, daß bei gleicher Sephadexmenge die Chance zur Zellbindung um so geringer wurde, je größer der mittlere Durchmesser der eingesetzten Sephadexpartikel war.

In Tabelle 4 wurden einige Partikelcharakteristika der gesiebten Sephadexfraktionen sowie das Bindeverhalten von S. marcescens HY an diese Partikel anhand der berechneten Bindekonstanten zusammengefaßt. Ein Vergleich der Spalten Q_{II} und k_{II} zeigt, daß zwischen der Chance zur Zellbindung und der jeweils verfügbaren Gesamtoberfläche der Sephadexpartikel eine gute Proportionalität besteht.

3.1.2.3. von Anzuchtmedium und Wuchsphase der Bakterien

Bedingt durch ihre Kleinheit haben Bakterien eine relativ große Zelloberfläche, bezogen auf ihr Volumen. Umweltfaktoren haben daher vielfältige Möglichkeiten, auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Bakterien einzuwirken. An dem Adhäsionsvorgang von S. marcescens HY an Sephadex sind offensichtlich Strukturen der Zelloberfläche beteiligt, die in direktem Kontakt mit dem sie umgebenden Medium stehen. Mit den folgenden Versuchen sollte geprüft werden, ob Änderungen des pH-Wertes, der Ionenstärke, der Temperatur, des Anzuchtmediums und der Wuchsphase der Zellen einen Einfluß auf die Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadex ausüben.

Wuchsmedium. In manchen Fällen bedingt die Zusammensetzung des Anzuchtmediums die Synthese bestimmter Polymere der Zelloberfläche von Bakterien, die bei Adhäsionsvorgängen eine wichtige Rolle spielen. [a]

---

[a] S. mutans synthetisiert mit Hilfe einer zellgebundenen Glycosyltransferase nur in Gegenwart von Saccharose die Glucane, die für die Bindung der Bakterien an Zahnoberflächen notwendig sind. Bei Zellen, die in einem Glc-Medium wuchsen, konnte keine Glycosyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden (zitiert in 35).

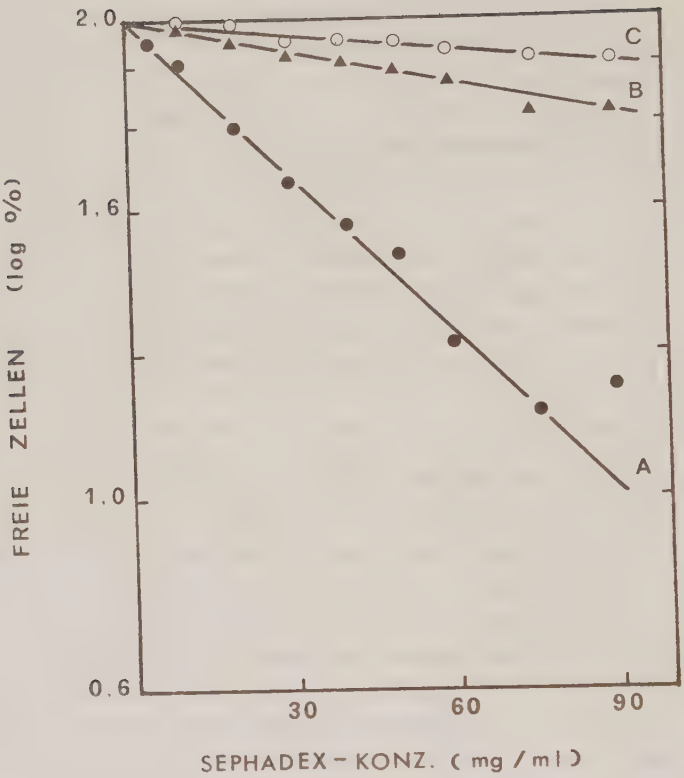

Abb. 4: Abhängigkeit der Zellbindung von S. marcescens HY von der Konzentration und dem Typ (d.h. der mittleren Größe) der zum Bindetest eingesetzten Sephadex G25-Partikel superfine (A), medium (B) und coarse (C).

Sephadextyp	Kugel-Charakteristika				Bindekonstante [c] = k (ml. g^{-1})	
	Mittelwerte			Q [b]		
	Durchmesser = ø (µm)	Oberfläche [a] = S ($cm^2 \times 10^{-5}$)	Volumen [a] = V ($cm^3 \times 10^{-9}$)	I ($\times 10^4$)	II	I II
Superfine (A)	20,3	1,29	4,38	0,295	(12,8)	25,2 (11,4)
Medium (B)	108,3	36,84	665,10	0,055	(2,4)	4,9 (2,2)
Coarse (C)	258,7	210,20	9065,40	0,023	(≙1,0)	2,2 (≙1,0)

Tab. 4: Abhängigkeit der Bindung von S. marcescens HY (Wildtyp) an Sephadexpartikel von den mittleren Oberflächen der beim Bindetest jeweils eingesetzten Sephadex G25 Fraktionen.

[a] Oberflächen (S) und Volumina (V) der Kugeln wurden nach den Formeln $S = 4\pi r^2$ bzw. $V = 4/3\pi r^3$ berechnet.

[b] Q = Quotient aus Oberfläche (S) und Volumen (V).

[c] $-k = \frac{2,3 (\log N - \log N_o)}{c}$ N = % freie Zellen im Überstand bei einer bestimmten Sephadexkonzentration (c).

Die Werte in Klammern beziehen sich auf $Q_{(C)} = 1$ bzw. auf $k_{(C)} = 1$.

Um den Einfluß verschiedener Anzuchtmedien auf die Bindefähigkeit stationärer Zellen von S. marcescens HY zu untersuchen, wurden Minimal- und Komplettmedien verwendet. In den M9 Minimalmedien wurden 0,4 % (w/v) Glc, Gly, Mal bzw. Sacc als C-Quelle eingesetzt. In einer zweiten Reihe von Ansätzen wurden den M9 Minimalmedien außer den o.g. jeweiligen C-Quellen zusätzlich 0,25 % (w/v) Casaminoacids zugegeben. Die Anzucht der Kulturen erfolgte wie üblich (siehe 2.5.). Die durch Zentrifugation gewonnenen Zellsedimente wurden in P-Puffer resuspendiert und anschließend sofort im Bindetest eingesetzt. Als Trägersubstanz wurde Sephadex G15 verwendet.

In Tab. 5 sind die Versuchsergebnisse sowie die verschiedenen Nährmedien zusammengefaßt. Die in Minimalmedien gezüchteten Zellen konnten sich bedeutend besser (ca. 45 %) als die in Komplettmedien gewachsenen Zellen an Sephadex binden. Die Art der im M9 Minimalmedium eingesetzten C-Quelle hatte keine erkennbare Auswirkung auf die Bindeeigenschaften der Zellen. Wurden den Minimalmedien jedoch Casaminoacids hinzugefügt, nahm der Anteil gebundener Zellen deutlich ab.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die nachfolgenden Versuche M9 Glc-Medium zur Anzucht der Bakterien verwendet.

Wuchsphase. Die Bindefähigkeit eines Bakteriums kann in verschiedenen Wachstumsphasen aufgrund von Änderungen der Zellbeweglichkeit bzw. der Quantität oder Qualität der Polymere auf der Zelloberfläche variieren. Da der Stamm HY unbeweglich ist (Winkler, pers. Mitteilung), blieb der erstgenannte Faktor unberücksichtigt. Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob die Bindung von S. marcescens HY an Sephadex von der Wuchsphase der Zellen abhängig ist. Die Bindung logarithmischer und stationärer Zellen an Sephadex wurde wie üblich bestimmt (siehe 2.7.). Abweichend von den standardisierten Bedingungen wurde in diesem Fall Sephadex G15 anstelle von Sephadex G25 verwendet. Die Extinktion (CD_{580}) der Zellsuspension im Bindetest betrug 0,8; sie entsprach damit einem Zelltiter von ca. 2×10^9/ml bei stationären und ca. $1{,}2 \times 10^9$/ml bei logarithmischen Kulturen.

Nährmedien	Anteil gebundener Zellen (%)[a]	Signifikanz-Prüfung P-Wert [b]
I. M9 Minimalmedium		
+ Glucose	45,0 ± 2,17	-
+ Glycerin	48,4 ± 1,63	0,21
+ Maltose	52,1 ± 6,80	0,33
+ Saccharose	38,3 ± 8,29	0,43
II. M9 Minimalmedium + Casaminoacids		
+ Glucose	25,1 ± 5,10	$3,0 \times 10^{-4}$
+ Glycerin	21,7 ± 3,06	$< 10^{-9}$
+ Maltose	22,5 ± 8,21	$8,0 \times 10^{-3}$
+ Saccharose	20,1 ± 8,24	$3,4 \times 10^{-3}$
III. Komplettmedien		
Nährbouillon	22,3 ± 9,0	$1,35 \times 10^{-2}$
Peptone-Hefe	29,1 ± 4,47	$1,40 \times 10^{-3}$

Tab. 5: Bedeutung des zur Anzucht verwendeten Nährmediums für die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G15.

[a] Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen ± der Standardabweichung.

[b] Der Wert P wurde in Bezug auf den Wert des M9 Glc-Mediums mit Hilfe des Chi-Tests (91) berechnet.

- - -

Die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Versuchen wurden in Tab. 6 zusammengestellt. Die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex erfolgte unabhängig von der Wuchsphase der Zellen.

Wuchsphase der Bakterien	Versuch Nr.	Anteil gebundener Zellen (%)
Logarithmische	1	39,4
	2	39,8
	3	41,5
		$\bar{x} = 40,2 \pm 1,12$
Stationäre	1	39,3
	2	39,8
	3	37,9
		$\bar{x} = 39,0 \pm 0,98$

Tab. 6: Bedeutung des physiologischen Zustandes der Zellen des Stammes HY für ihre Bindung an Sephadex G15.

$\bar{x}$ = Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

Zur Signifikanz-Prüfung wurde der Chi-Test (91) verwendet. Der P-Wert beträgt 0,42, d.h. die gefundenen Unterschiede sind ungesichert.

- - -

3.1.2.4. von pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur

Wie in der Einleitung erläutert wurde, beruht die Anheftung von S. mutans an Zahnoberflächen primär auf einer enzymatischen Reaktion. Von den meisten enzymatischen Reaktionen weiß man, daß sie optimal nur innerhalb eines bestimmten pH-, Ionenstärke- und Temperaturbereiches stattfinden. Während der pH-Wert und die Ionenstärke des Mediums die Nettoladung bzw. den Hydratations- und Ionisierungsgrad der Polymere auf der Zelloberfläche der Bakterien bestimmen, bedingt die Temperatur u.a. den Viskositätsgrad dieser bakteriellen Polymere.

pH-Wert	Puffer 0,1 M	Anteil gebundener Zellen (%)	Klumpung
3,8	Na-Azetat	-	+
4,0	"	-	+
4,1	"	-	+
4,3	"	-	+
4,6	"	46,8	-
4,8	"	46,0	-
4,9	"	46,5	-
5,2	"	48,4	-
5,4	"	48,8	-
5,5	"	46,7	-
5,7	Sørensen-Na-Phosphat	46,1	-
6,0	"	42,5	-
6,2	"	45,2	-
6,3	"	45,2	-
6,9	"	42,1	-
7,0	"	42,5	-
7,3	"	43,2	-
7,5	"	40,1	-
7,7	"	43,6	-
8,0	"	45,4	-
8,2	"	45,0	-
8,4	Tris-HCl	-	+
8,6	"	-	+
8,8	"	-	+
9,0	"	-	+

Tab. 7: Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine bei verschiedenen pH-Werten.

Eine stationäre M9 Glc-Kultur des Stammes HY wurde wie unter 2.5. beschrieben gezüchtet und gewaschen. Die durch Zentrifugation sedimentierten Zellen wurden in Puffer von verschiedenen pH-Werten resuspendiert und dann im Bindetest eingesetzt (siehe 2.7.). Die Sephadexpartikel wurden ebenfalls in den entsprechenden Pufferlösungen suspendiert.

- - -

pH-Wert. Die Bindung von S. marcescens HY an Sephadex innerhalb eines pH-Bereichs von 3,8 - 9,0 wurde nach der in Abschnitt 2.7. beschriebenen Methode bestimmt. Die Zellbindung erfolgte in dem pH-Bereich von 4,6 - 8,2 unabhängig von der Wasserstoffionenkonzentration der Umgebung (Tab. 7). Ober-

und unterhalb dieses Bereiches trat bei den Ansätzen Zellklumpung ein.

Die Mehrheit der Bakterien hat im pH-Bereich von 2 - 3 einen isoelektrischen Punkt (pI). In der Nähe dieses isoelektrischen Punktes hat man bei vielen Bakterienspezies Zellklumpung beobachtet (02). Dieses Phänomen kann durch die Tatsache erklärt werden, daß die Bakterien unter derartigen Bedingungen keine elektrische Nettoladung haben und deshalb keine elektrostatische Abstoßung unter den Zellen erfolgt. Ungeklärt bleibt jedoch, warum die Zellen im vorliegenden Fall auch bei einem höheren pH-Wert klumpten. Da bekannt ist, daß Tris manchmal einen toxischen Effekt auf Bakterienzellen ausübt, wurde bei einer Wiederholung des Versuches an seiner Stelle HEPES-Puffer verwendet. Die Zellklumpung trat dennoch auf.

Ionenstärke. Der Effekt der Ionenstärke auf die Zellbindung an Sephadex wurde in einem Bereich von 0,05 - 3,0 M untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine 3 M NaCl-Stammlösung verwendet. Wie Tab. 8 zeigt, erfolgte die Zellbindung in dem gewählten Meßbereich unabhängig von der Ionenstärke des Mediums.

Temperatur. Sowohl die Temperatur des Mediums, in dem die Zellbindung stattfindet, als auch die Anzuchttemperatur der Bakterien kann die Bindeeigenschaften der Zellen auf verschiedene Weise beeinflussen. So variieren z.B. die Bindungsraten gewisser Meeresbakterien an festen Oberflächen sowie die von Rinderpansenbakterien an Stärkekörnern in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur (30,66). Außerdem ist bekannt, daß die Antigenfaktoren K88, K99, CFA/I und CFA/II der EPEC-Stämme bei einer Anzuchttemperatur von unter 30°C nicht produziert werden (27,71).

In den folgenden Experimenten sollte einerseits geklärt werden, ob die Temperatur während des Bindetests die Adhäsionseigenschaften von Zellen beeinflußt, die bei 30°C gewachsen waren (optimale Anzuchttemperatur von S. marcescens HY). Andererseits wurde die Bindefähigkeit solcher Zellen untersucht, die bei verschiedenen Temperaturen gewachsen waren.

NaCl-Konzentration (M)	Anteil gebundener Zellen (%)
0,05	40,0 ± 3,21
0,10	40,0 ± 2,35
0,25	39,9 ± 7,17
0,50	40,3 ± 5,82
1,00	38,8 ± 7,61
1,50	39,9 ± 7,52
2,00	40,0 ± 10,22
2,50	46,2 ± 11,20
3,00	47,3 ± 9,70

Tab. 8: Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine bei unterschiedlicher Ionenstärke.

Eine stationäre M9 Glc-Kultur des Stammes HY wurde wie unter 2.5. beschrieben gezüchtet und gewaschen. Die durch Zentrifugation sedimentierten Zellen wurden in den NaCl-Lösungen mit unterschiedlicher Ionenstärke resuspendiert und dann im Bindetest eingesetzt (siehe 2.7.). Die Sephadexpartikel wurden ebenfalls in den entsprechenden Salzlösungen suspendiert. Die aufgeführten Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen ± der Standardabweichung.

- - -

Abb. 5 zeigt den zeitlichen Verlauf der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine bei verschiedenen Temperaturen. Die Zellbindung erfolgte innerhalb des gewählten Bereiches von 6 - 37°C temperaturunabhängig. Der Maximalwert wurde bei allen Temperaturen nach 5 min Inkubation erreicht.

Auch bei Zellen, die bei verschiedenen Temperaturen gewachsen waren (20, 30, 38°C), wurden keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Bindeeigenschaften festgestellt (siehe Tab. 9).

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sprechen alle dafür, daß die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex, zu-

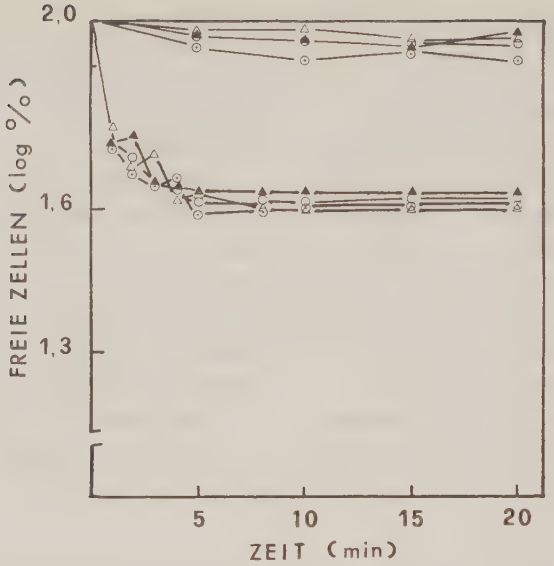

Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine bei verschiedenen Temperaturen.

Bakterien- und Sephadexsuspensionen wurden 10 min bei der entsprechenden Temperatur vorinkubiert. Danach wurden 8 ml Bakteriensuspension (Zelltiter ca. 4×10^9/ml) mit 9,8 ml P-Puffer vermischt, der 720 mg Sephadex G25 fine enthielt. Die Ansätze wurden in einem Schüttelwasserbad (Stufe 6) inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und sofort durch ein Nylongewebe (10 µM Maschenöffnung) filtriert. Die Extinktion (OD_{580}) der Filtrate wurde bestimmt. Als Kontrollen dienten Ansätze, die unter gleichen Bedingungen, aber ohne Sephadex getestet wurden (siehe obere Kurven).

Temperaturen: △—△ 6°C

○—○ 21°C

○—○ 30°C

▲—▲ 37°C

mindest die primäre Reaktion, ein nichtenzymatischer Vorgang ist.

Anzuchttemperatur (°C)	Anteil gebundener Zellen (%)
20	45,0
30	44,2
38	40,1

Tab. 9: Bedeutung der Anzuchttemperatur der Bakterien für die Bindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

- - -

3.1.3. Hemmbarkeit der Zellbindung an Sephadex G25 fine

In den Experimenten zur Hemmbarkeit der Zellbindung an Sephadex sollte die Wirkung a) einer Vorbehandlung der Zellsuspensionen z.B. durch Hitze oder Enzyme, b) bestimmter Substanzen bei einer direkten Zugabe in den Bindetest (siehe 2.7.) und c) einiger Substanzen auf bereits gebundene Bakterien (Reversibilität) untersucht werden. Für alle Versuche wurden stationäre M9 Glc-Kulturen verwendet.

3.1.3.1. Inhibitoren des Energiestoffwechsels

Die Kulturen wurden wie im Abschnitt 2.5. beschrieben angezogen und gewaschen. Anschließend wurden sie in P-Puffer mit 25 mM KCN bzw. 0,2 % (w/v) NaN_3 resuspendiert (Zelltiter ca. 4×10^9/ml). Als Kontrollen dienten Kulturen, die keinen Zusatz enthielten. Die Ansätze wurden 15 min bei 30°C in einem Schüttelwasserbad (Stufe 6) inkubiert und sofort danach im Bindetest eingesetzt. Ziel des Versuches war es festzustellen, ob die Bindefähigkeit der Zellen nachläßt, wenn sie mit den o.g. Atmungsinhibitoren vorbehandelt werden. Die Untersuchung der Bindeeigenschaften der Kulturen ergab jedoch keine Unterschiede zwischen den vorbehandelten Zellen und denen der Kontrollansätze. Der Adhäsionsvorgang ist demnach unab-

hängig von metabolischer Energie.

3.1.3.2. Detergenzien (Tween)

Nichtionische Detergenzien vom Tween-Typ sind gemäß der Klassifizierung von Lipiden nach ihrem Verhalten in wäßrigen Lösungen polare Lipide, die zu der Gruppe der löslichen Amphiphile gehören (48). Aufgrund ihres hydrophoben Charakters sind sie oft in der Lage, mit einigen Proteinen, Lipid-Doppelschichten sowie biologischen Membranen zu interagieren (48).

In den folgenden Experimenten sollte geprüft werden, ob das Detergenz Tween 80 die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex beeinträchtigen kann. Tween ist der Handelsname einer Serie von Polyoxyethylenderivaten von Sorbitan Fettsäure-Estern (siehe Abb. 6)

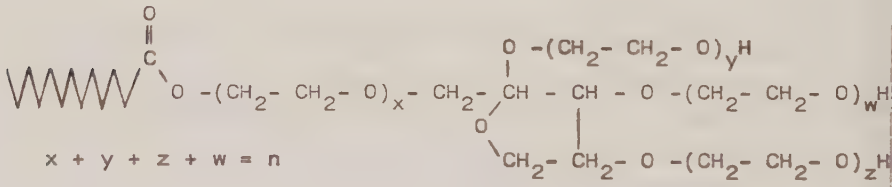

Abb. 6: Tween.

Die abgebildete Formel stellt nur eine molekulare Variante aus einer komplexen Anordnung verschiedener möglicher Strukturen dar. n = Polyoxyethylen-Polymerisationsgrad. (Nach Helenius und Simons, 48)

- - -

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß 0,1 % (w/v) Tween 80 die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine vollständig unterband. Wurde den Ansätzen kein Tween zugegeben (Kontrollen), konnten die eingesetzten Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen zu etwa 45 % an Sephadex adhärieren. Die Durchführung dieses Experiments erfolgte nach Methode 2.7. (siehe Hemmtest).

Um festzustellen, ob die Zellbindung an Sephadex ein reversibler Vorgang ist, wurde versucht, bereits gebundene Zellen durch Tween 80 von dem Sephadexträger zu eluieren. Der Versuch verlief folgendermaßen: Die Bindung der Zellen an Sephadex erfolgte in der üblichen Weise (siehe 2.7.). Die Sephadexkonzentration betrug, abweichend von den standardisierten Bedingungen des Bindetests, 50 mg/ml. Nach 30 min Inkubation bei 30°C wurden die Reagenzgläser 10 min bei ZT belassen, um das Absetzen der Sephadexpartikel zu ermöglichen. Der Überstand wurde dann mit einer Pasteur-Pipette entnommen und seine Extinktion (OD_{580}) sowie sein Keimtiter wurden bestimmt. Das zellbeladene Sephadex (100 mg) wurde in 1 ml P-Puffer aufgenommen und in ein kleines Chromatographierohr (8 x 12 mm) gefüllt. Zur Elution wurde zunächst P-Puffer und dann 0,25 % Tween 80 (in P-Puffer) verwendet. In jeder Fraktion wurde neben der Anzahl der Zellen (Neubauer-Zählkammer) auch der Keimtiter bestimmt (siehe 2.6.).

Abb. 7 zeigt das Ergebnis der Elution. Der Logarithmus des Keimtiters wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Von $2{,}2 \times 10^9$ Zellen, die an 100 mg Sephadex gebunden waren, konnten lediglich $1{,}14 \times 10^9$, d.h. ca. 52 % eluiert werden. Etwa 2/3 wurden schon durch P-Puffer eluiert (34,7 %); das restliche Drittel löste sich aber erst bei Verwendung der Tween-Lösung. In einem analogen Versuch, in dem anstelle der Tween 80-Lösung ein linearer Natriumchloridgradient (0,1 - 1,0 M) als Elutionsmittel verwendet wurde, fand keine weitere Ablösung der Bakterien statt. Es blieb ungeklärt, warum nur 52 % der an den Sephadexträger gebundenen Zellen durch die Elution abgelöst wurden. Das Ergebnis bestätigte sich aber in drei voneinander unabhängigen Versuchen. Bei anderen Versuchen, bei denen zellbeladene Sephadexpartikel im batch-Ansatz (d.h. ohne Umfüllen in ein Chromatographierohr) mit Tween 80 versetzt wurden, verursachte das Detergenz eine 100 %ige Freisetzung der gebundenen Zellen.

Die gewählte Tween 80-Konzentration von 0,25 % ist für Serratia-Zellen weder bakterizid noch bakteriostatisch. Dies wurde nachgewiesen, indem eine Bakteriensuspension mit Tween 80 verschieden lang inkubiert wurde. Innerhalb des un-

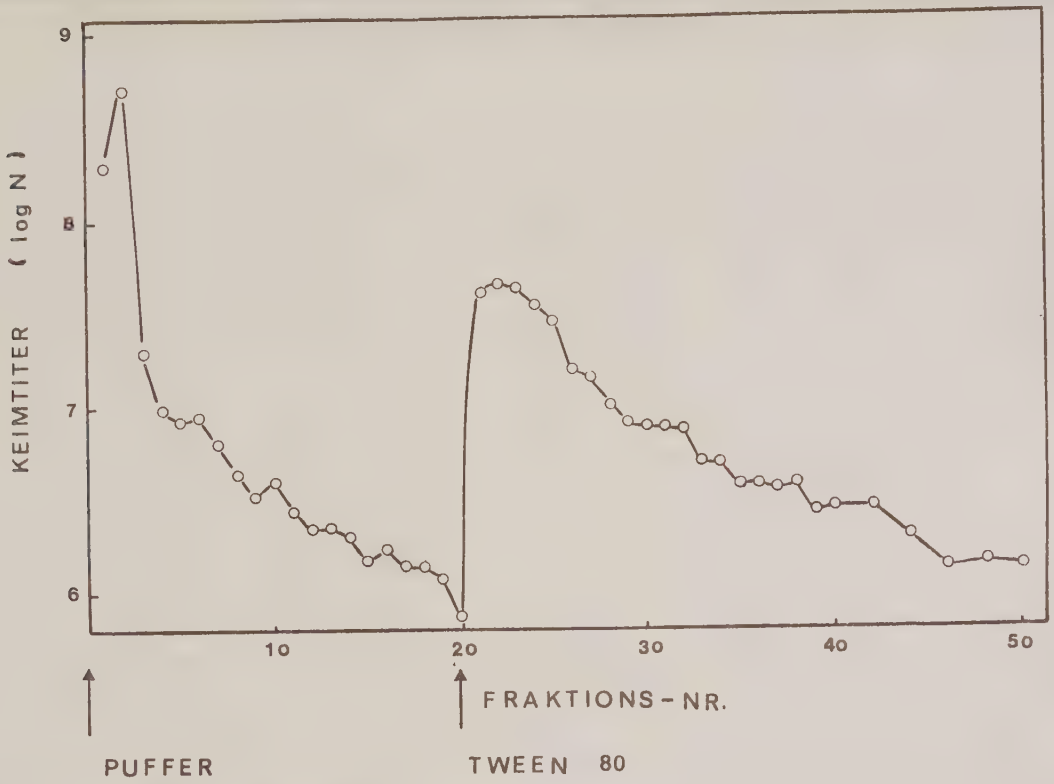

Abb. 7: Elution gebundener S. marcescens HY-Zellen von Sephadex mit Puffer und einer Tween 80-Lösung. Fraktionen à 7 Tropfen wurden gesammelt. Diese Menge entsprach ca. 0,4 ml bei der Verwendung von P-Puffer als Eluant, bzw. 0,25 ml bei der Verwendung der Tween-Lösung. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde mit einer peristaltischen Pumpe konstant auf 30 sec/Fraktion gehalten. Die Elution fand bei ZT statt.

Zeit (min)	Keimtiter	
	0,25 % Tween 80	Phosphatpuffer
0	$2{,}25 \times 10^9$	$1{,}95 \times 10^9$
30	$2{,}27 \times 10^9$	$2{,}06 \times 10^9$
60	$2{,}06 \times 10^9$	$1{,}99 \times 10^9$
120	$2{,}40 \times 10^9$	$2{,}07 \times 10^9$

Tab. 10: Wirkung von Tween 80 auf die Koloniebildungsfähigkeit (Keimtiter) stationärer Zellen von S. marcescens HY.

Eine stationäre M9 Glc-Kultur des Stammes HY wurde zentrifugiert und in neutralem P-Puffer resuspendiert (Zelltiter ca. 4×10^9/ml). Die Suspension wurde 3 h bei 30°C gerollt (Hungerung). Danach wurde 1 ml Bakteriensuspension mit 1 ml 0,5 %iger (w/v) Tween 80-Lösung (in P-Puffer) vermischt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, der anstelle der Tweenlösung 1 ml P-Puffer enthielt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben von 0,1 ml entnommen und der jeweilige Keimtiter bestimmt (siehe 2.6.). Die Inkubation der Proben erfolgte im Rollapparat bei 30°C.

- - -

tersuchten Zeitraums (2 h) änderte der Keimtiter sich nicht (siehe Tab. 10).

Um zu klären, ob die chemische Zusammensetzung des hydrophoben Anteils des Tween-Moleküls für seine Hemmwirkung von Bedeutung ist, wurde die Bindefähigkeit der Bakterien in Anwesenheit verschiedener Tween-Typen getestet, einschließlich solcher, die aus gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren bestehen. In Tab. 11 wurden die Versuchsergebnisse sowie die jeweiligen Fettsäurereste und HLB-Werte der verwendeten Tween-Typen zusammengefaßt. Alle Tween-Typen waren

Handelsname [a]	Fettsäurerest	HLB-Wert [b]	Hemmung der Zellbindung (%)
Tween 20	Monolaurat	16,7	100
Tween 40	Monopalmitat	15,6	98
Tween 60	Monostearat	14,9	100
Tween 80	Monooleat	15,0	100

Tab. 11: Eignung verschiedener Tween-Typen zur Hemmung der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

Die Zellbindung an Sephadex erfolgte nach Methode 2.7. Die Tweenkonzentration betrug 0,25 % (w/v).

[a] Fettsäureester von Polyoxyethylen-Sorbitan.

[b] Das "hydrophil-lipophile Gleichgewicht" (HLB) ist eine empirisch bestimmte, willkürlich festgelegte Einheit, die die Größe und Stärke der entgegengesetzten hydrophoben und hydrophilen Gruppen berücksichtigt. Stark hydrophobe Surfaktanten haben einen niedrigen HLB-Wert; mit zunehmender Hydrophilie steigt der HLB-Wert.

- - -

befähigt, die Zellbindung an Sephadex zu verhindern. Die Tween-Konzentration betrug immer 0,25 %.

Tween 80 kann die Zellbindung an Sephadex nicht nur hemmen, sondern auch revertieren. Die in diesen Untersuchungen verwendeten Tween-Konzentrationen führen zu keiner irreversiblen Schädigung der Bakterienzellen. Auch andere Tween-Typen sind geeignet, die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex zu verhindern. Ihre Hemmwirkung erfolgt unabhängig von der Art des jeweiligen Fettsäurerestes. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von hydrophoben Strukturen oder Gruppen an der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex.

.3.3. Proteine

Meadows und Fletcher fanden, daß die Zellbindung einiger Meeresbakterien an Oberflächen durch Zugabe verschiedener Proteine in die Versuchsansätze entweder hemmbar oder stimulierbar war (64,29).

Mit den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob Proteine auch einen Effekt auf die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine ausüben. Die verwendeten Proteine unterschieden sich u.a. in ihren Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten. Die Endkonzentration der Proteine im Hemmtest (siehe 2.7.) betrug jeweils 1,5 µM.

Von 15 untersuchten Proteinen nichtbakteriellen Ursprungs waren Concanavalin A, Alkohol-Dehydrogenase, Pepsin, Rinderserumalbumin, Fibrinogen und Fetuin sehr wirksame Inhibitoren. In der verwendeten Konzentration hemmten sie die Zellbindung zu mehr als 50 % (siehe Tab. 12). Von den untersuchten sauren Proteinen hemmten alle bis auf Ovomucoid und Ovoalbumin. Dagegen zeigte keines der verwendeten basischen Proteine eine signifikante Hemmwirkung. Eine stimulierende Wirkung ging von keinem der Proteine aus.

Wie man aus Abb. 8 entnehmen kann, existiert zwischen den isoelektrischen Punkten der untersuchten Proteine und ihrer Hemmwirkung keine strenge lineare Korrelation. Dennoch ist auffallend, daß alle stark hemmfähigen Proteine einen isoelektrischen Punkt im sauren pH-Bereich besitzen. Aus diesem Grund zeigen sie bei dem in diesem Experiment verwendeten neutralen P-Puffer eine negative Nettoladung. Ähnliche Resultate erhielt Fletcher bei der Untersuchung des Bindeverhaltens einer marinen Pseudomonas-Art (29). Sie fand heraus, daß nur saure Proteine fähig waren, die Bindung dieser Bakterien an Polystyren-Platten zu hemmen.

Eine Abhängigkeit der Hemmwirkung der in dieser Arbeit untersuchten Proteine von ihren Molekulargewichten kann nicht ganz ausgeschlossen werden, da alle Proteine mit einem Molekulargewicht von unter 30×10^3 sich als schlechte Inhibitoren erwiesen bzw. vollständig unwirksam waren (siehe Abb. 9).

Nr	Proteine	MG x 10^{-3}	pI	Hemmung (%)
1	Pepsin	34,7	1,0	76,6
2	Fetuin, Typ IV	46,0	3,3	52,6
3	Ovomucoid	28,0	3,8 - 4,4	0,0
4	Ovoalbumin	44,5	4,6	0,0
5	Rinderserumalbumin, Fr. II	66,0	4,7 - 4,9	75,3
6	Concanavalin A	110,0	4,74 4,95 5,32 5,7 [a]	100,0
7	Alkohol-Dehydrogenase	141,0	5,4	80,7
8	Fibrinogen, Fr. I, Typ I	330,0	5,5	65,1
9	Aldolase	158,0	6,1	35,3
10	ϑ-Globulin	160,0	6,6	30,7
11	Myoglobin	17,0	7,0	18,6
12	Ribonuclease A	13,7	7,8	0,86
13	Ribonuclease B	14,7	9,6	0,0
14	Avidin	66,0	10,0	1,9
15	Cytochrom C	13,0	10,6	19,9

Tab. 12: Wirkung verschiedener Proteine auf die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

[a] experimentell ermittelte Werte von Entlicher et al. (24)

Die Proteinkonzentration im Hemmtest betrug jeweils 1,5 µM.

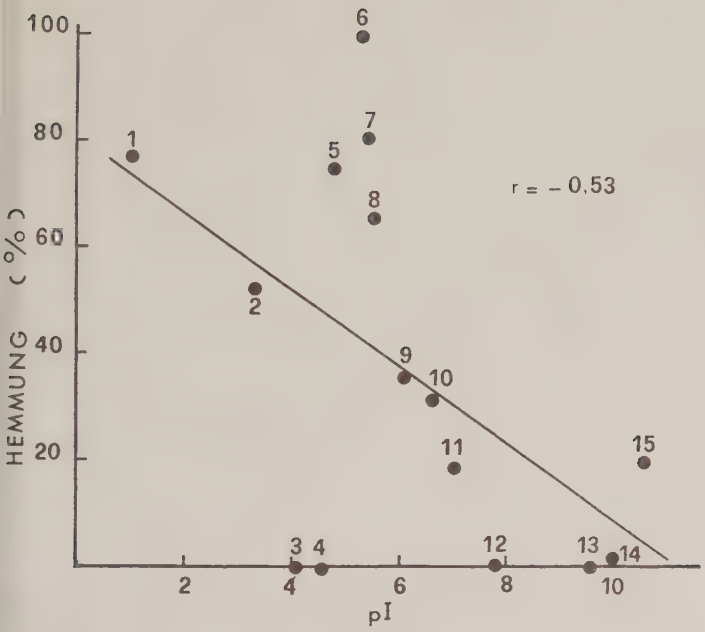

Abb. 8: Die Hemmwirkung von 15 verschiedenen Proteinen auf die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine in Abhängigkeit vom jeweiligen isoelektrischen Punkt der Proteine.

Jedes Protein hat eine Schlüsselzahl, deren Bedeutung aus Tab. 12 ersichtlich ist.
Die negative Korrelation (r = -0,53) wird durch die Regressionsgerade gezeigt.

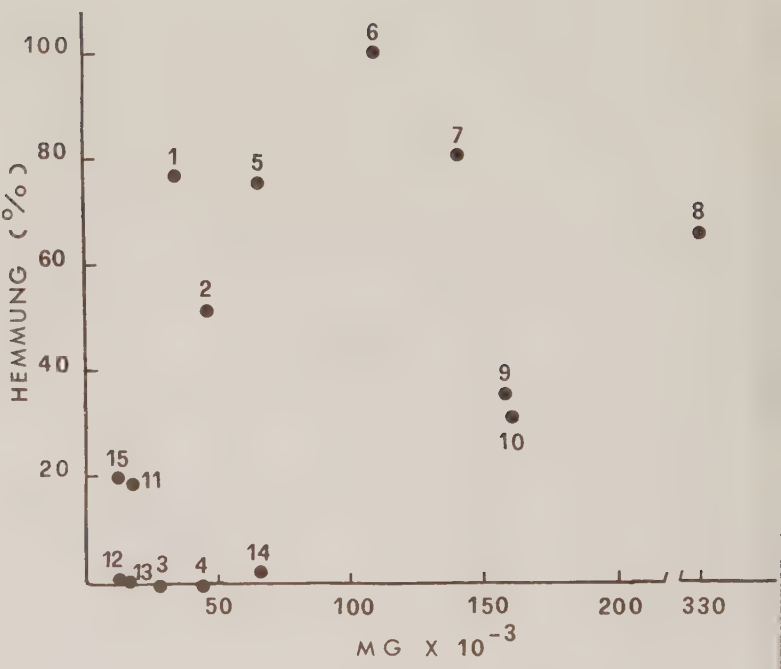

Abb. 9: Die Hemmwirkung von 15 verschiedenen Proteinen auf die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine in Abhängigkeit vom jeweiligen Molekulargewicht der Proteine.

Jedes Protein hat eine Schlüsselzahl, deren Bedeutung aus Tab. 12 ersichtlich ist.

Abb. 10 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von Fibrinogen und Pepsin in einem Bereich von 1 - 15 µg/ml. Pepsin erreichte seine maximale Hemmwirkung schon bei einer Konzentration von etwa 0,1 µM (ca. 3,47 µg/ml). Dieser Effekt kann nicht auf einer enzymatischen Einwirkung des Pepsins auf die Bakterienzellen beruhen, da sich Pepsin bei neutralem pH-Wert im denaturierten Zustand befinden muß. Daß diese Annahme zutrifft, wurde folgendermaßen nachgewiesen: Zu jeweils 2,5 ml einer Bakteriensuspension in P-Puffer (Zelltiter = 4×10^9/ml) wurden 2,5 ml 3,0 µM Pepsin (in P-Puffer) bzw. 2,5 ml P-Puffer (Kontrolle) gegeben. Die Ansätze wurden 30 min auf einem Rotationsschüttler (120 Upm) bei 30°C inkubiert. Um das Pepsin zu eliminieren, wurden die Zellen dann zweimal mit P-Puffer gewaschen (siehe 2.5.). Anschließend wurden sie auf ihre Bindefähigkeit in Abwesenheit von Pepsin untersucht (siehe 2.7.). Diejenigen Bakterien, die mit Pepsin behandelt worden waren, konnten genauso effektiv an Sephadexpartikel binden wie jene, die in P-Puffer ohne Pepsin inkubiert worden waren.

Weiterhin wurde untersucht, ob Pepsin die Zellbindung an Sephadex rückgängig machen kann. Dazu ließ man die Zellen zunächst unter den normalen Bedingungen an Sephadex binden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden den Kontrollansätzen 50 µl P-Puffer, den anderen Proben 50 µl einer 61,5 µM Pepsin-Lösung zugegeben. Das Resultat dieses Experiments war eine 75 - 90 %ige Zellfreisetzung durch Pepsin.

Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigen die Annahme, daß eine gewisse Korrelation zwischen der Hemmwirkung von Proteinen und ihren isoelektrischen Punkten besteht. Nur Proteine, deren isoelektrische Punkte einem sauren pH-Wert entsprechen, waren in der Lage, die Zellbindung an Sephadex signifikant zu hemmen. Pepsin, ein stark saures Protein, konnte die Zellbindung an Sephadex nicht nur hemmen, sondern auch revertieren. Die nachgewiesene Hemmwirkung erfolgte schon bei niedrigen Konzentrationen und unabhängig von der proteolytischen Aktivität des Pepsins.

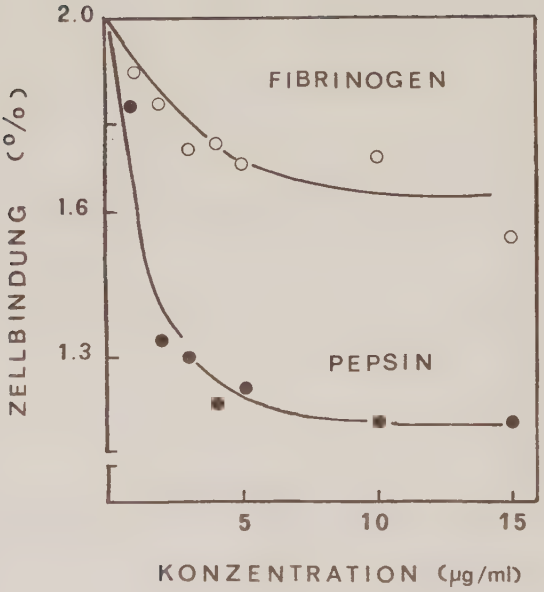

Abb. 10: Hemmwirkung von Pepsin bzw. Fibrinogen auf die Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

3.1.3.4. Mono-, Oligo-, Polysaccharide

Die Interaktion bestimmter Bakterien mit Glykorezeptoren wird durch einige Monosaccharide und/oder ähnlich strukturierte Substanzen kompetitiv gehemmt, wie z.B. die Anheftung nichtpathogener Stämme von E. coli an Epithelzellen des Dünndarms durch Mannose (25). Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, daß die Liganden auf der Zelloberfläche von E. coli Mannose-enthaltende Rezeptoren auf der Oberfläche der Epithelzellen erkennen und sich mit ihnen verbinden.

Da Sephadex ein Polyglucan ist, könnte man in Analogie zu dem vorhergehenden Beispiel erwarten, daß einige gelöste Polysaccharide und/oder Bausteine, die ähnliche strukturelle Eigenschaften wie Dextran aufweisen, spezifisch mit den an der Zellbindung beteiligten Strukturen auf der Oberfläche der Bakterien interagieren und so die Zellbindung verhindern. Um die Spezifität der Zellbindung an Sephadex zu untersuchen, wurden daher verschiedene Mono-, Oligo- und Polysaccharide sowie einige Mono- und Polysaccharidderivate im Hemmtest eingesetzt (siehe 2.7.). Zunächst wurde eine Reihe verschiedener Polysaccharide (Endkonzentration 0,1 % [w/v]) untersucht. [a] Die bei ZT in P-Puffer unlöslichen Polysaccharide Polygalakturonat und Carboxymethylcellulose wurden durch Erhitzen auf 100°C (10 min) gelöst. Die Hemmwirkung von Polysacchariden ließ sich nicht immer sicher nachweisen, da mehrere von ihnen (Gummi arabicum, Hyaluronat, Chondroitinsulfat, Laminarin und Polygalakturonat) Zellagglutination verursachten (siehe Tab. 13). Andere Polysaccharide (Mannan, Inulin, Dextran T70, Colominat und Pullulan) bewirkten bei dieser Konzentration keinen Hemmeffekt. Alginat und Carboxymethylcellulose waren nur schwache Inhibitoren. Interessanterweise konnten einige neutrale Polyglucane, wie Glykogen, Amylopektin und Amylose, die Zellbindung bei einer Konzentration von 0,1 % zu 35,4, 47,4 bzw. 26,0 % unterbinden, während andere, wie Pullulan und Dextran T70, unwirksam waren. (Für die Bedeutung der in Tab. 13 verwendeten Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis).

---

[a] Bei anionischen Polysacchariden wurde immer das entsprechende Natrium-Salz für die Versuche verwendet, mit Ausnahme der Hyaluronsäure, von der das Kalium-Salz eingesetzt wurde.

Polysaccharide	Chemische Hauptkomponenten	Bindungstyp	Hemmung der Zellbindung (%)
A. Zellagglutinierende			
Chondroitinsulfat (Na)	GlcUA, GalNAc(SO_3H)	ß 1,3; ß 1,4	nicht bestimmbar
Gummi arabicum	Gal, GlcUA (Ara, Rha) [a]	verschiedene	"
Hyaluronat (K)	GlcUA, GlcNAc	ß 1,3; ß 1,4	"
Laminarin	Glc (ManOH) [a]	ß 1,3 (ß 1,6) [a]	"
Polygalakturonat (Na)	GalUA	∝ 1,4	"
B. Nicht Zellagglutinierende			
Alginat (Na)	GulUA, ManUA	∝ 1,4; ß 1,4	16,0
Amylopektin	Glc	∝ 1,4; ∝1,6	47,4
Amylose	Glc	∝ 1,4	26,0
Carboxymethylcellulose (Na)	Glc($-CH_2-COO^-$)	ß 1,4	13,7
Colominat (Na)	NeuUANac	∝ 1,5	0,0
Dextran T70	Glc	∝ 1,6 (∝1,3) [a]	0,0
Glykogen	Glc	∝ 1,4; ∝ 1,6	35,4
Inulin	Frc	ß 2,1	0,0
Mannan	Man	∝ 1,6; ∝1,2; ∝1,3	0,0
Pullulan	Glc	∝ 1,4; ∝1,6	0,0

Tab. 13: Wirkung verschiedener Polysaccharide auf die Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.
Die Hemmbarkeit der Zellbindung an Sephadex durch die entsprechenden Polysaccharide wurde nach Methode 2.7. bestimmt. Die Polysaccharidkonzentration betrug 0,1 % (w/v).
[a] Die chemischen Komponenten bzw. Bindungstypen in Klammern sind im Molekül nur in geringem Umfang vertreten.

In Versuchen, in denen die Konzentration einiger Polysaccharide erhöht wurde, ergab sich, daß die Hemmwirkung von Amylopektin und Glykogen mit zunehmender Konzentration stieg, [a] während Pullulan und Dextran T70 bei höheren Konzentrationen (0,4 %) die Zellen agglutinieren ließen. Auf eine Untersuchung der Hemmwirkung von Amylose bei höheren Konzentrationen als 0,1 % wurde verzichtet, da die wasserunlöslichen Amylose-Micellen die Ergebnisse des Bindetests hätten verfälschen können.

Abb. 11a zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von Glykogen und Amylopektin auf die Zellbindung an Sephadex. Glykogen und Amylopektin bewirkten eine 50 %ige Inhibition bei einer Konzentration von ca. 4,17 mg/ml bzw. 1,25 mg/ml (siehe Abb. 11b).

Um lösliche Kartoffelstärke und die Stärke-Derivate Hydroxypropylstärke, Carboxymethylstärke und Stärkeaminether im Bindetest einsetzen zu können, wurden sie vor Versuchsbeginn durch Erhitzen auf 100°C (15 min) gelöst. Diese Behandlung war bei der oxidativ depolymerisierten Stärke nicht erforderlich, da sie bei ZT löslich ist. Lösliche Kartoffelstärke sowie alle Stärke-Derivate, bis auf die oxidativ depolymerisierte Stärke, hemmten die Zellbindung bei einer Konzentration von 0,6 % zu über 50 % (siehe Tab. 14).

Überraschenderweise waren mehrere Dextran-Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichts bei einer Konzentration von 0,25 % im Hemmtest unwirksam (siehe Tab. 15). Eine Erhöhung der Dextrankonzentration (1,0 %) führte bei allen Ansätzen, die Dextran-Fraktionen mit einem Molekulargewicht von über 40 x 10^3 entnielten, zur Bildung von Zellagglutinaten.

Während Dextransulfat (MG ca. 500 x 10^3) bei einer Konzentration von 1,0 % keinen Hemmeffekt ausübte, bewirkte DEAE-Dextran (MG ca. 500 x 10^3) bei der gleichen Konzentration eine 30 %ige Hemmung der Zellbindung.

---

[a] Die Versuche wurden mit Glykogen aus Miesmuschel von Serva (Nr. 23550, Charge C) durchgeführt. Bei Verwendung von Charge F der gleichen Firma agglutinierten die Zellen.

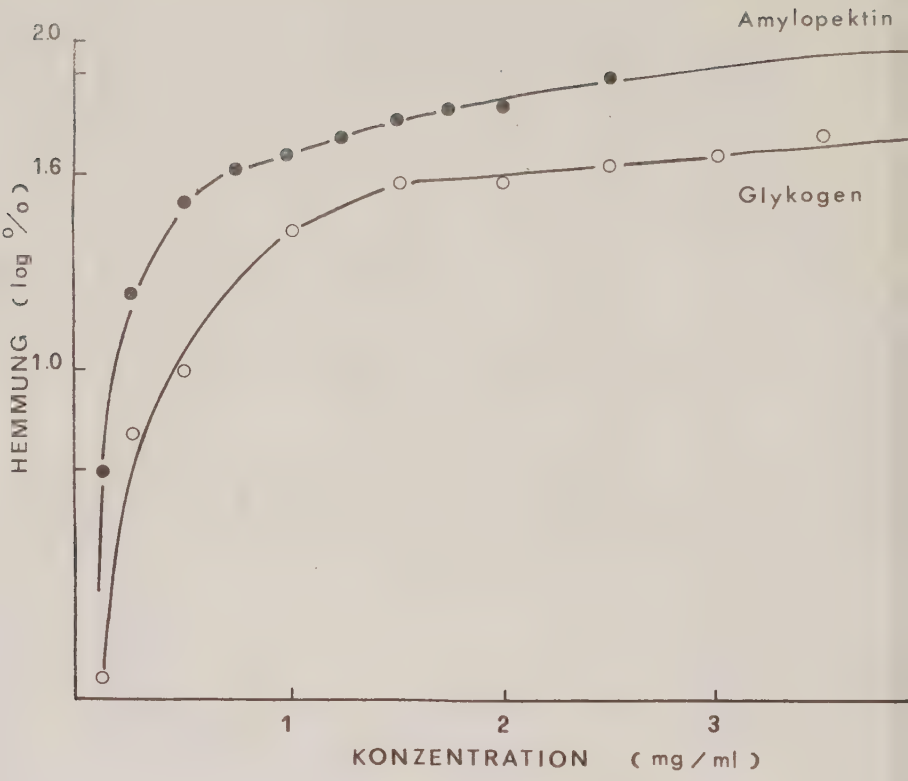

Abb. 11 : Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung von Amylopektin und Glykogen auf die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

11a: Halblogarithmische Auftragung der prozentualen Hemmwirkung gegen die Inhibitor-Konzentration in den verschiedenen Versuchsansätzen.

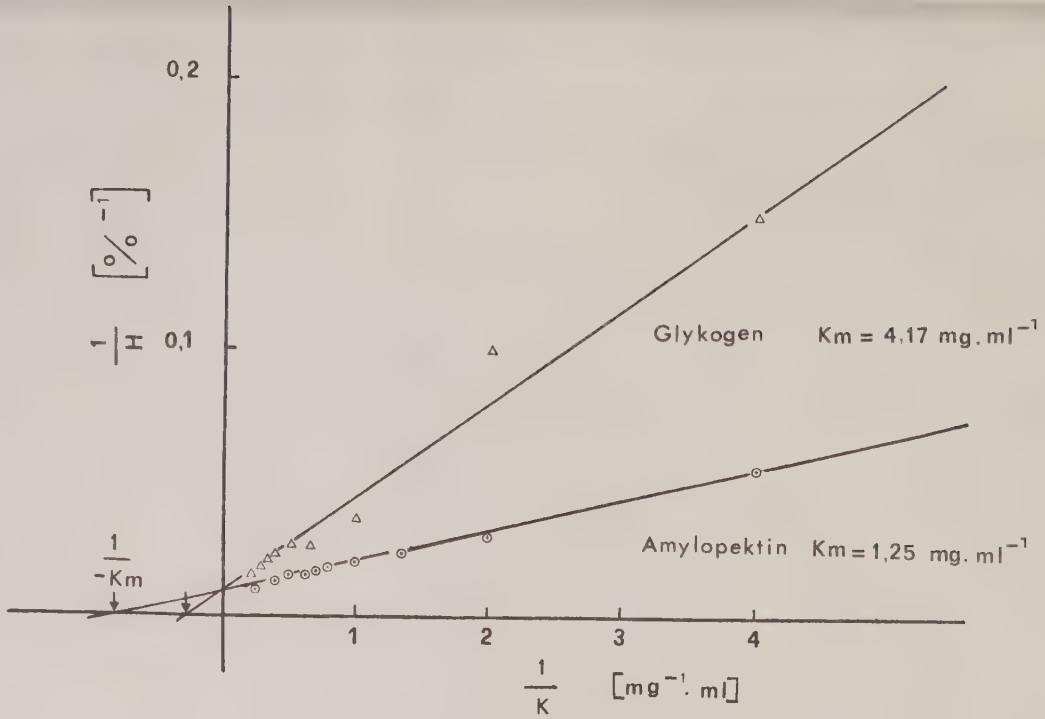

Abb. 11b: Doppelt-reziproke Darstellung (Lineweaver-Burk) der Ergebnisse von Abb. 11a.

km = Inhibitor-Konzentration, bei der eine 50 %ige Hemmung der Zellbindung erreicht wird.

Stärke-Derivat	Konzentration (%)	Hemmung der Zellbindung (%)
Stärke (Kartoffel)	0,6	50,6
	0,4	44,5
	0,2	41,5
Hydroxypropylstärke (Mais)	0,6	65,0
	0,4	48,7
	0,2	60,3
Carboxymethylstärke (Mais)	0,6	68,2
	0,4	70,0
	0,2	59,6
Stärkeaminether (Kartoffel)	0,6	50,0
	0,4	48,2
	0,2	30,6
oxidativ depolymerisierte Stärke (Kartoffel)	0,6	1,6
	0,4	7,6
	0,2	3,2

Tab. 14: Wirkung verschiedener Stärke-Derivate auf die Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

Die Hemmbarkeit der Zellbindung an Sephadex durch die entsprechenden Stärke-Derivate in den o.g. Endkonzentrationen wurde nach Methode 2.7. bestimmt.

- - -

Kontrolluntersuchungen, in denen die Extinktion (OD_{580}) der Polysaccharidansätze vor und nach dem Hemmtest bestimmt wurde, ergaben, daß S. marcescens HY während der Versuche mit keinem der verwendeten Polysaccharide wuchs.

Von 21 getesteten Substanzen, darunter Mono-, Di-, Tri- und Methylsaccharide, war keine dazu in der Lage, die Zell-

Dextran-Fraktion MG x 10^{-3}	Anteil gebundener Zellen (%)
-	45,2
3,6	44,7
10,0	45,9
20,0	48,1
40,0	43,6
60,0	49,4
110,0	42,2
250,0	47,4
500,0	46,8
2000,0	43,0

Tab. 15: Wirkung von Dextran-Fraktionen unterschiedlicher Molekulargewichte auf die Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

Die Hemmbarkeit der Zellbindung an Sephadex durch die verschiedenen Dextran-Fraktionen wurde nach Methode 2.7. bestimmt. Die Polysaccharidkonzentration betrug 0,25 % (w/v).

[a] Mittleres Molekulargewicht nach Angaben des Herstellers.

- - -

bindung in der verwendeten Konzentration (0,1 M) zu hemmen (siehe Tab. 16). [a]

[a] In früheren Versuchen zeigte Maltose im Konzentrationsbereich von 0,05 M - 0,1 M eine stimulierende Wirkung auf die Zellbindung an Sephadex (72). Dieser Befund ließ sich mit anderen Maltose-Präparaten später nicht mehr reproduzieren. Die Ursache dieser Diskrepanz ist unbekannt.

Saccharide	Anteil gebundener Zellen (%)
Keine (Kontrolle)	42,8
A. Trisaccharide	
Melizitose	41,6
Raffinose	38,3
B. Disaccharide	
Cellobiose	48,1
Gentobiose	40,9
Lactose	48,0
Maltose	46,4
Melibiose	43,5
Saccharose	43,8
Turanose	42,0
Trehalose	45,4
C. Monosaccharide	
2-Desoxy-D-Glucose	46,7
D-Galaktose	41,6
D-Glucose	41,3
D-Mannose	40,7
L-Sorbose	39,8
D. Methylsaccharide	
D-Fucose	46,9
L-Rhamnose	43,7
Methyl α D-Glucosid	46,0
Methyl β D-Glucosid	45,5
Methyl α D-Mannosid	47,1
Methyl α D-Xylosid	44,3

Tab. 16: Wirkung verschiedener Mono-, Di-, Tri- und Methylsaccharide auf die Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

Die in diesem Experiment verwendeten Kulturen wurden mit neutralem P-Puffer gewaschen, der 0,1 % (w/v) NaN_3 enthielt (siehe 2.5.). Die durch Zentrifugation sedimentierten Zellen wurden dann direkt in der jeweiligen 0,2 M Saccharidlösung (in P-Puffer + 0,2 % NaN_3) resuspendiert. Natriumazid wurde verwendet, um das Wachstum der Zellen während des Versuchverlaufs zu verhindern. Die Zellsuspensionen wurden sofort im Hemmtest eingesetzt (siehe 2.7.). Getestete Saccharidkonzentration = 0,1 M.

.1.3.5. Isomaltooligosaccharide

Glucose, Maltose und andere getestete Saccharide sind in einer relativ hohen Konzentration (0,1 M) unfähig, die Zellbindung an Sephadex zu hemmen (siehe 3.1.3.4.). Wie schon vorher erwähnt wurde, ist Dextran ein Polyglucan, dessen Glucosylreste vorwiegend α 1,6 glykosidisch miteinander verknüpft sind. Ausgehend von der Erkenntnis, daß die Hemmung der Interaktion einiger Lektine mit bestimmten Glykokonjugaten durch Saccharide abhängig von ihrer Kettenlänge (MG) variieren kann [a], sollte in den folgenden Versuchen die Wirkung von Isomaltooligosacchariden auf die Bindefähigkeit von S. marcescens HY-Zellen an Sephadex untersucht werden.

Isomaltooligosaccharide, die aus mehr als 4 Glucoseresten bestehen, sind nicht käuflich zu erwerben, sie lassen sich jedoch durch eine saure hydrolytische Spaltung des Dextranmoleküls und anschließende Gel-Filtration des Hydrolysats gewinnen.

Isolierung und Charakterisierung der Isomaltooligosaccharide. Die saure Hydrolyse von Dextran T70 erfolgte nach der Methode von Wandersman et al. (89). In Vorversuchen wurde festgestellt, daß eine Verlängerung der Inkubationszeit zu einer höheren Ausbeute an Oligosacchariden führte. Deshalb wurde in dieser Arbeit das Dextran, anstatt wie in der Anleitung von Wandersman et al. beschrieben 20 min, 30 min hydrolysiert. Das erhaltene Hydrolysat wurde mit $Ba(OH)_2.8H_2O$ neutralisiert und das dadurch entstandene Präzipitat ($BaSO_4$) durch mehrmalige Zentrifugation entfernt (siehe 2.11.1.). Der Kohlenhydratgehalt des Hydrolysats, bestimmt nach der Methode von Dubois et al. (18), betrug 7,9 g, d.h. etwa 79 % der ursprünglichen Dextranmenge.

Um die verschiedenen Produkte der Dextranhydrolyse voneinander zu trennen, wurde das Hydrolysat einer Gel-Filtration (Bio Gel P4) nach dem von Emmerling und Pfannenmüller entwickelten Verfahren (23) unterzogen. Die Trennung der ver-

---

[a] Die Interaktion von Concanavalin A mit Mannan wird durch D-Mannosederivate gehemmt. Di- und Trisaccharide, die aus α 1,2 Mannopyranosylresten bestehen, waren jedoch 4 bzw. 20 Mal effektivere Inhibitoren als das Methylmannopyranosid (38).

schiedenen Isomaltooligosaccharide wurde mit Hilfe eines Differential-Durchfluß-Refraktometers (Winopal) verfolgt. Die Bestimmung der Kohlenhydratkonzentration der eluierten Fraktionen erfolgte nach der Methode von Dubois et al. (18).

Abb. 12 zeigt ein repräsentatives Elutionsdiagramm eines Laufes, in dem der Gesamtkohlenhydratgehalt der Fraktionen gegen die Fraktionsnummern aufgetragen wurde. 11 verschiedene Oligosaccharide wurden nach ihrem Molekulargewicht relativ gut voneinander getrennt. Die Gipfel wurden aber nicht in ihrer Gesamtheit sichtbar, da das Ende eines auslaufenden Gipfels sich mit dem Anfang des nachfolgenden überlappte. Daher kann man annehmen, daß zumindest die ersten und die letzten Fraktionen eines jeden Gipfels Anteile des vorhergehenden bzw. nachfolgenden Oligosaccharids enthielten. Nachdem Fraktionsproben für die HPTLC (engl. High Performance Thin Layer Chromatography) entnommen worden waren, wurden diejenigen Fraktionen, aus denen sich ein Gipfel zusammensetzte, zu Pools vereinigt und gefriergetrocknet. Die erhaltene Menge an Oligosacchariden in den verschiedenen Pools variierte zwischen 84,3 mg und 129,3 mg.

Zur Überprüfung der Reinheit sowie zur Identifizierung der hergestellten Oligosaccharide wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt (siehe 2.11.3.). Die Chromatographieplatten wurden sechsmal hintereinander in dem Laufmittel n Butanol-Ethanol-H_2O im Verhältnis 2:2:1 (v/v) entwickelt (67). Ein Entwicklungsvorgang dauerte jeweils 85 min. Nach dem Besprühen der Platten mit 20 %iger H_2SO_4 bildeten die Oligosaccharide braune, gut erkennbare Flecken. Aus der Startlinie lösten sich 8 verschiedene Isomaltooligosaccharide, die den 8 letzten Gipfeln des Elutionsdiagrammes (Abb. 12) entsprachen. Es zeigte sich bei ihnen eine leichte Verunreinigung mit dem nächsthöheren bzw. nächstniederen Zucker. Die R_f-Werte der isolierten Oligosaccharide wurden bestimmt und mit denen der eingesetzten Referenzsubstanzen (Glucose, Isomaltose, Isomaltotriose) verglichen. Die Fraktionen, aus denen sich die drei letzten Gipfel zusammensetzten (in Abb. 12 I, II, III), enthielten Glucose, Isomaltose

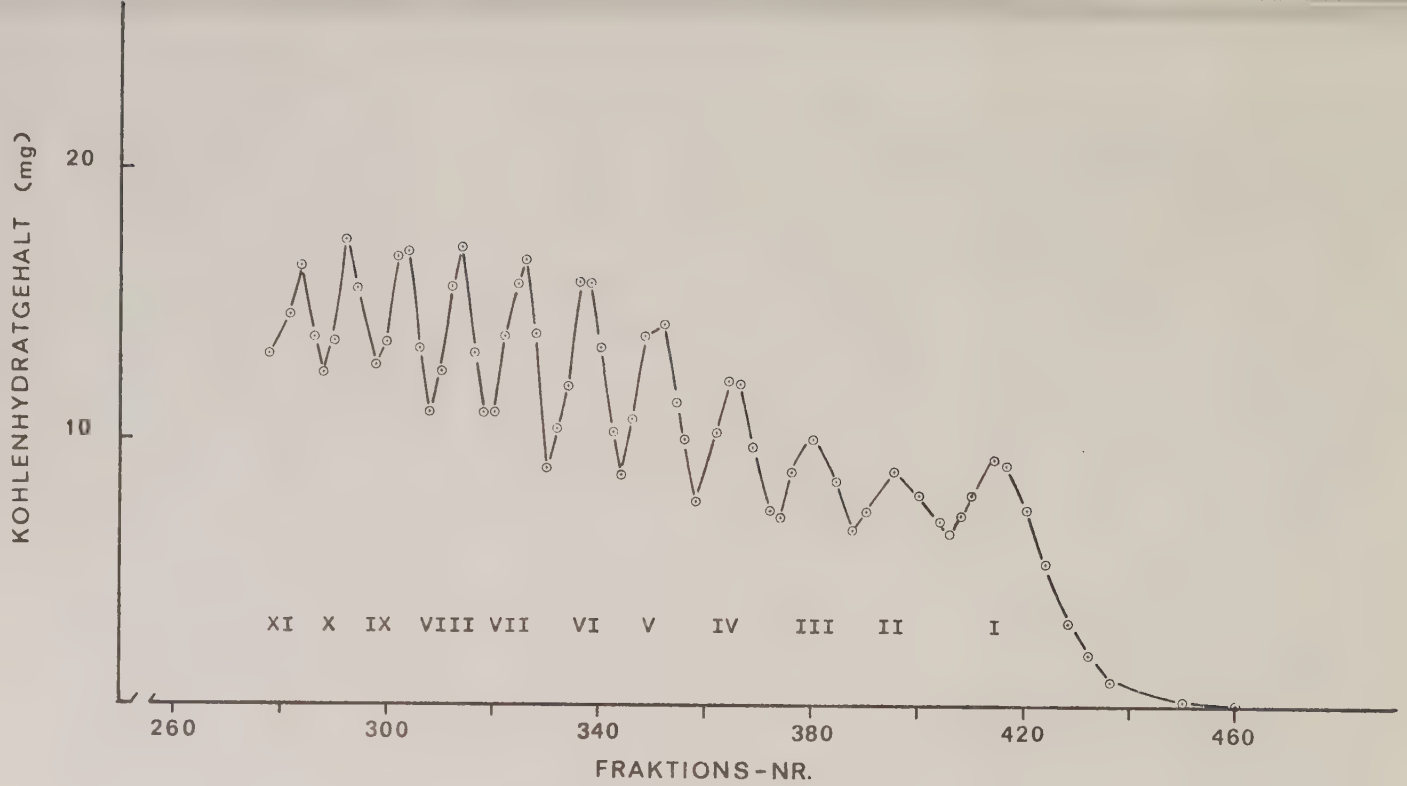

Abb. 12: Bio Gel P4-Gel Filtration des Dextran-Hydrolysates.

bzw. Isomaltotriose. Da weitere Referenzsubstanzen zur Identifizierung der nächsteluierten Oligosaccharide fehlten, wurden diese durch Bestimmung ihrer mittleren Kettenlänge charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde eine bestimmte Menge der gefriergetrockneten Oligosaccharide in A. dest. gelöst. Ihr Gesamtkohlenhydratgehalt wurde nach Dubois et al. (18) und ihr Reduktionsvermögen mittels Cu^{++}-Ionen in einem alkalischen Medium nach Nelson und Somogyi (85) bestimmt. Das Prinzip der letztgenannten Methode beruht auf einer Oxidation der glukosidischen Hydroxylgruppe am C-Atom 1. Da die Dextran-Oligosaccharide nur eine reduzierende Endgruppe je Molekül enthalten, errechnet sich die Kettenlänge folgendermaßen:

$$\text{mittlere Kettenlänge} = \frac{\text{Gesamtkohlenhydratgehalt } (\mu g)}{\text{Gehalt an reduzierenden Zuckern } (\mu g)}$$

In Tab. 17 wurden die Ausbeute an den verschiedenen Isomaltooligosacchariden, ihre durch HPTLC ermittelten R_f-Werte sowie ihre errechneten mittleren Kettenlängen zusammengestellt. Die Bestimmung der mittleren Kettenlängen ermöglichte eine eindeutige Identifizierung der durch die HPTLC nicht erfaßten Isomaltooligosaccharide. Die experimentell ermittelten Werte der isolierten Isomaltooligosaccharide kommen den theoretisch erwarteten sehr nahe. Leichte Abweichungen lassen sich durch die schon bei der Dünnschichtchromatographie festgestellten Verunreinigungen erklären.

Hemmwirkung von Isomaltooligosacchariden.

Bevor die Hemmbarkeit der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine durch die isolierten Isomaltooligosaccharide untersucht wurde, sollte festgestellt werden, ob diese von den Bakterien als Energie- oder C-Quelle verwertet werden können. Um Material zu sparen, geschah dies folgendermaßen: M9 Glc-O-Kulturen von S. marcescens HY wurden wie üblich angezogen (siehe 2.5.) und in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (10 min, 5900 x g, Rotor SS34). Die dadurch erhaltenen Zellsedimente wurden in M9 Medium ohne C-Quelle so resuspendiert, daß sich ein Zelltiter von ca. 1×10^8/ml er-

Substanz	Ausbeute (mg)	R_f-Wert	mittlere Kettenlänge
Glucose	-	0,147 (1,00)	1,00
Isomaltose	113,0	0,112 (0,761)	2,10
Isomaltotriose	121,4	0,085 (0,578)	3,00
Isomaltotetraose	92,3	0,063 (0,428)	4,09
Isomaltopentaose	111,0	0,037 (0,251)	4,73
Isomaltohexaose	106,7	0,020 (0,136)	6,22
Isomaltoheptaose	129,3	0,009 (0,061)	6,51
Isomaltooctaose	127,4	0,005 (0,034)	8,05
Isomaltononaose	127,9	- -	8,96
Isomaltodecaose	84,3	- -	10,40
Isomaltoundecaose	101,0	- -	11,06

Tab. 17: Ausbeute und einige Charakteristika der isolierten Isomaltooligosaccharide.

Die Werte in Klammern beziehen sich auf den R_f-Wert der Glucose = 1,0.

- - -

gab. Anschließend wurde die Kultur 3 h bei 30°C gerollt (33 Upm), um eventuell vorhandene Reservestoffe abzubauen (Hungerung). Jeweils 0,1 ml dieser Kultur wurden dann auf M9 Medium-Platten ohne C-Quelle gespatelt und bis zum Trocknen bei ZT stehengelassen. Die Rückseite jeder Platte wurde mit Hilfe eines Filzschreibers in vier gleiche Felder unterteilt. In die Mitte eines jeden Feldes wurde ein anderes Isomaltooligosaccharid in fester Form aufgetragen. Alle Isomaltooligosaccharide lösten sich sofort auf. Als Kontrolle dienten Glucose und Maltose. Nach 24, 48 und 72 h zeigte sich ein Zellwachstum nur auf den Feldern, die die Kontrollsubstanzen enthielten. Diese Ergebnisse machten eine Untersuchung der Hemmbarkeit der Zellbindung durch Isomaltooligosaccharide in Anwesenheit eines metabolischen Giftes (z.B. NaN_3) unnötig.

Substanz	Zellklumpung [a]			
	Konzentration (x 10^{-2} M)			
	5	2,5	1,25	0,625
Isomaltose	-	-	-	-
Isomaltotriose	+	+	-	-
Isomaltotetraose	-	-	-	-
Isomaltopentaose	++	++	-	-
Isomaltohexaose	++	++	++	-
Isomaltoheptaose	++	++	++	-
Isomaltooctaose	++	++	++	-
Isomaltononaose	++	++	++	-
Isomaltodecaose	++	++	++	-
Isomaltoundecaose	++	++	++	-

Tab. 18: Zellklumpung von S. marcescens HY durch verschiedene Isomaltooligosaccharide.

Die Bestimmung der Zellklumpung durch Isomaltooligosaccharide erfolgte bei 30°C nach Methode 2.8. , jedoch wurden in diesem Fall 0,5 ml Bakteriensuspension mit 0,5 ml Isomaltooligosaccharidlösung vermischt.

[a] Bewertung: - = keine Zellklumpung, + = leichte Zellklumpung, ++ = starke Zellklumpung.

- - -

Die verschiedenen Isomaltooligosaccharide wurden im Hemmtest eingesetzt (siehe 2.7.). Bei einigen von ihnen konnte keine Hemmwirkung nachgewiesen werden, da sie die Zellen in der zunächst verwendeten Konzentration (0,05 M) klumpen ließen. Andere zeigten bei dieser Konzentration keine Hemmwirkung. Durch Herabsetzen der Konzentration (6,25 x 10^{-3} M) ließ sich zwar die Zellklumpung unterbinden, eine Hemmwirkung war dennoch nicht feststellbar (siehe Tab. 18). Es bleibt ungeklärt, warum die für diese Arbeit hergestellte Isomaltotriose

bei einer Konzentration von 0,05 M eine geringe Zellklumpung verursachte, Isomaltose und Isomaltotetraose aber nicht. Alle anderen Ansätze ab Isomaltopentaose wiesen bei dieser Konzentration eine deutliche Zellklumpung auf. Wurde die Konzentration bis auf $1,25 \times 10^{-2}$ M gesenkt, blieb dieser Effekt bei o.g. Oligosaccharid aus und setzte erst beim nachfolgenden (Isomaltohexaose) ein. Die Charakterisierung der Isomaltooligosaccharide durch die Dünnschichtchromatographie ergab eine Verunreinigung mit dem höheren und niederen Zucker. Demnach wäre es möglich, daß die bei Verwendung von Isomaltopentaose beobachtete Zellklumpung in Wirklichkeit ein Effekt der Isomaltohexaose ist. Eine andere Interpretation ließe den Schluß zu, daß die Konzentration der Isomaltopentaose höher sein muß als die der Isomaltohexaose, um Zellklumpung hervorzurufen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß nur Isomaltooligosaccharide mit einer Kettenlänge von 5 oder mehr Glucoseresten in der Lage sind, Zellklumpung zu verursachen.

3.1.3.6. Enzyme, Chelatbildner, Harnstoff, Perjodat

Proteine und Polysaccharide sind die am häufigsten an der Zellbindung an Oberflächen beteiligten Komponenten der Gramnegativen Bakterien. Deshalb wurde die Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine nach Einwirkung verschiedener Substanzen untersucht, die o.g. Strukturen verändern können.

Die Verfahren zur Vorbehandlung der Bakterien mit den verschiedenen Agenzien sind in Abschnitt 2.12. beschrieben. Die verwendeten Substanzen sowie die Ergebnisse des Bindetests und die Bedingungen der jeweiligen Vorbehandlung sind in Tab. 19 zusammengefaßt. Durch die Vorbehandlung mit Proteinase K bzw. mit Harnstoff verloren die Zellen ihre Bindeeigenschaften. Da Harnstoff in höheren Konzentrationen Proteine denaturiert, und Proteinase K ein Enzym ist, das spezifischerweise Proteine spaltet, ist anzunehmen, daß durch diese Vorbehandlungen Protein(e) oder Protein-enthaltende Oberflächenstrukturen angegriffen wurden, die für die Zellbindung an Sephadex wichtig sind. Eine Vorbehandlung mit

Substanzen	Bedingungen der Vorbehandlungen [a]				Zelldichte nach der Vorbehandlung (%) [b]	Bindetest [c]
	Konzentration	Verwendete Puffer	Zeit	Temperatur		Zellbindung (%)
A. Enzyme	(EU/ml)					
Proteinase K	20	0,1 M P-Puffer, pH 7,0 + 2 mM $MgCl_2$	1 h	35°C	100	0,0
Trypsin	80 (160)	"	3 h	35°C	100	77,6
∝-Amylase	40	0,1 M Azetatpuffer, pH 5,0	3 h	30°C	100	100,0
∝ 1,4 → ∝ 1,6 Amyloglucosidase	20	"	3 h	30°C	100	100,0
Dextranase	65	0,1 M P-Puffer, pH 6,0	5 min	37°C	nicht bestimmbar	nicht bestimmbar (Zellklumpung)
B. Sonstige	(M)					
Harnstoff	4,0	0,1 M P-Puffer, pH 7,0	15 min	30°C	90	12,0
Natriumperjodat	0,01	"	15 min	2°C	75	100,0
EDTA A)	0,002	0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5	2 min	30°C	102	106,0
B)	0,01	0,1 M P-Puffer, pH 7,0	15 min	30°C	100	110,0

Tab. 19: Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine nach Vorbehandlung der Zellen mit verschiedenen Agenzien.

[a] Die Bakterien wurden mit den entsprechenden Agenzien wie in 2.12. beschrieben vorbehandelt.

[b] Die angegebenen Prozentsätze beziehen sich auf die Extinktion(OD_{580}) der jeweiligen Kontrolle.

[c] Die Zellbindung an Sephadex wurde wie üblich bestimmt (siehe 2.7.).

Trypsin (Konzentration = EU/ml) hemmte die Zellbindung nur schwach (22,4 %). Eine Erhöhung der Trypsinkonzentration bei der Vorbehandlung (160 EU/ml) beeinflußte die Hemmwirkung jedoch nicht. Die Vorbehandlung der Bakterien mit Proteinase K führte zu keiner irreversiblen Schädigung der Zellen, denn sie behielten ihre Koloniebildungsfähigkeit. Während die Extinktion (OD_{580}) der mit Trypsin behandelten Zellsuspensionen unverändert blieb, zeigte sich nach der Behandlung mit Harnstoff eine 10 %ige Abnahme der Zelldichte. Aufgrund der für das Experiment verwendeten hohen Konzentration des Harnstoffes ist dies Ergebnis wahrscheinlich auf einen osmotischen Effekt zurückzuführen.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit glucanohydrolytischen Enzymen (α-Amylase, $\alpha 1,4 \rightarrow \alpha 1,6$ Amyloglucosidase) bzw. mit Perjodat, einem Reagenz, daß die in vielen Polysacchariden vorhandenen Hydroxylgruppen oxidiert, veränderte ihr Bindeverhalten nicht. Am Ende der Perjodat-Inkubation stellte sich jedoch heraus, daß die Extinktion (OD_{580}) der Zellsuspension um 25 % geringer war, als zu Beginn des Experiments. Diese Abnahme ist aufgrund der relativ niedrigen verwendeten Konzentration des Perjodats nicht durch einen osmotischen Vorgang erklärbar, sondern läßt eher einen toxischen Effekt des Perjodats auf die Bakterienzellen vermuten.

Die Wirkung einer Vorbehandlung der Zellen mit Dextranase auf ihr Bindeverhalten konnte nicht ermittelt werden, da die Zellen nach einigen Minuten Inkubation mit dem Enzym grobe Klumpen bildeten, die durch Zentrifugation und anschließende Resuspension der Zellen in frischem P-Puffer nicht aufzulösen waren.

Eine Behandlung von E. coli mit EDTA setzt bis zu 50 % der Lipopolysaccharide der äußeren Membran frei (58). Um zu prüfen, ob eine solche Behandlung die Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadex beeinträchtigt, wurden logarithmische Zellen 2 min mit EDTA inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM $MgCl_2$ gestoppt (58). Es stellte sich heraus, daß die vorbehandelten Zellen ebenso gut an Sephadex binden konnten, wie die der Kontrollansätze (siehe

Tab. 19, EDTA - A). Auch im Bindeverhalten stationärer Zellen, die 15 min mit EDTA vorbehandelt wurden, traten keine Unterschiede auf (Tab. 19, EDTA - B).

3.1.3.7. Hitze

Eine Zellsuspension in P-Puffer (Zelltiter ca. 5×10^9/ml) wurde 5 min auf 100°C erhitzt. Nach Zentrifugation in ei-Sorvall-Zentrifuge (10 min, 5900 x g, Rotor SS34) wurden die dadurch gewonnenen Zellsedimente in frischem P-Puffer resuspendiert. Eine Überprüfung der Zellbindung an Sephadex (siehe 2.7.) ergab, daß die Zellen ihre Bindefähigkeit vollständig verloren hatten. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß eine für die Anheftung der Bakterien notwendige Oberflächenstruktur hitzedenaturierbar ist. Der Verlust der Bindeeigenschaften der Zellen durch die Hitzebehandlung könnte aber auch auf eine Ablösung der entsprechenden Bindestrukturen zurückzuführen sein.

3.1.4. Spezifität der Zellbindung

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, welche chemisch-strukturellen Eigenschaften auf der Seite des Bindeträgers für seine Interaktion mit S. marcescens HY notwendig sind.

3.1.4.1. Ergebnisse eines screening Programmes

Es wurde die Bindung logarithmischer Zellen an verschiedene partikuläre Substanzen unterschiedlicher chemischer Struktur bestimmt. Aufgrund der unterschiedlichen Partikelform und Gesamtoberfläche der Trägersubstanzen wurde nur eine halbquantitative Messung der Zellbindung durchgeführt. In Tab. 20 sind die verwendeten Trägersubstanzen sowie die Versuchsergebnisse aufgeführt. Eine Zellbindung fand nur dann statt, wenn das Trägermaterial aus Polyglucanen bestand. In den Ansätzen, in denen Gelatinepartikel als Träger verwendet wurden, konnte eine Zellbindung aufgrund der Viskosität der Partikel nicht eindeutig nachgewiesen werden. Während bei Verwendung von Glaspartikeln keine Zellbindung feststellbar war, wurde bei anderen Versuchen beobachtet, daß ein geringer Anteil der Zellen an bestimmtes Glasmaterial adhärierte.

Trägersubstanz	Herkunft	Partikel		Chemische Zusammensetzung	Zellbindung [b]
		Form	mittlere Durchmesser (µm) [a]		
Bio Gel P2	Bio Rad	Kugel	40 - 80	Polyacrylamid	-
Cellulose TLC	Serva	Faser	19	Cellulose	++
Cytodex	Pharmacia	Kugel	60 - 87	Dextran, mit positiv geladenen Gruppen substituiert	++
Gelatine	Boehringer [c]	unregelmäßig	20 - 80	Gelatine	±
Glas	Corning Glas Works	Kugel	120 - 200	Silika	-
Kartoffelstärke	Merck	unregelmäßig	nicht angegeben	Amylose, Amylopektin u.a.	++
Kopolymer	Serva	Kugel	80 - 150	Styrol, 8 % Divinylbenzol	-
Kiesel Gel GC	Serva	unregelmäßig	150 - 200	Silika	-
Sephadex G25 fine	Pharmacia	Kugel	20 - 80	Dextran	++
Servacel	Serva	unregelmäßig	100 - 200	Carboxymethylcellulose	+

Tab. 20: Zellbindung von S. marcescens HY an verschiedene Trägermaterialien.

90 mg der verschiedenen Trägermaterialien wurden in 1 ml P-Puffer, pH 7,0, suspendiert und über Nacht stehengelassen. Zu den Trägersuspensionen wurde je 1 ml einer logarithmischen Kultur in P-Puffer (Zelltiter = $1{,}2 \times 10^9$/ml) gegeben. Die Ansätze wurden 30 min bei 30°C gerollt (33 Upm). Nachdem die Träger sich abgesetzt hatten, wurde die Extinktion (OD_{580}) des Überstandes bestimmt. Dann wurden die Träger mikroskopisch auf Zellbindung untersucht.

[a] Angaben des Herstellers, in trockenem Zustand gemessen.

[b] Bewertung: ++ = gute Bindung, + = wenig Bindung, ± = ungewiß, - = keine Bindung.

[c] Diese Substanz stellte uns Dr. W. Hartmeier von Boehringer, Ingelheim zur Verfügung.

Da die Zellbindung aber nicht grundsätzlich an jedes Glasmaterial erfolgte, ist diese Unstimmigkeit wahrscheinlich auf Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der verschiedenen Glassorten zurückzuführen. Eine andere Interpretation wäre, daß die bereits an Glaspartikel gebundenen Zellen aufgrund der durch Reibung zwischen den Partikeln verursachten Scherkräfte wieder ins Medium freigesetzt wurden. Die Zellbindung an Glas wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Mit zunehmender Konzentration der partikulären Polyglucane stieg der Anteil gebundener Zellen (siehe Abb. 13).

Die Ergebnisse von Tab. 20 und Abb. 13 deuten darauf hin, daß S. marcescens HY spezifisch Polyglucanstrukturen erkennt und sich an diese bindet. Die relativ gute Zellbindung an Stärkekörner macht es verständlich, daß wasserlösliche Stärke und Amylopektin (siehe 3.1.3.4.) die Zellbindung an Sephadex G25 fine hemmen können.

3.1.4.2. Zellbindung an chemisch modifizierte Sephadex- und Stärkepartikel

In dem vorangegangenen Abschnitt wurde beschrieben, daß S. marcescens HY-Zellen vorzugsweise an Träger binden, die sich aus Polyglucanen zusammensetzen. Um festzustellen, ob eine chemische Modifizierung dieser Träger die Zellbindung beeinträchtigt, wurde in den nachfolgenden Experimenten kommerziell erhältliche Stärke- und Sephadex-Derivate sowie für diese Arbeit azetyliertes Sephadex als Bindeträger verwendet. Als Stärke- bzw. Sephadex-Derivate bezeichnet man jene Produkte, die durch Reaktion der Hydroxylgruppen mit organischen oder anorganischen Reagenzien gebildet werden. Die Einführung funktioneller Gruppen in den partikulären Träger verursacht eine Veränderung seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Die Herstellung von Sephadexazetat mit niedrigem Substitutionsgrad erfolgte durch Veresterung mit Essigsäureanhydrid in einem alkalischen Medium (siehe 2.10.). Als Nebenprodukt bildete sich Natriumazetat, das nach Neutralisierung mit HCl mit Wasser ausgewaschen wurde (siehe Abb. 14). Nach

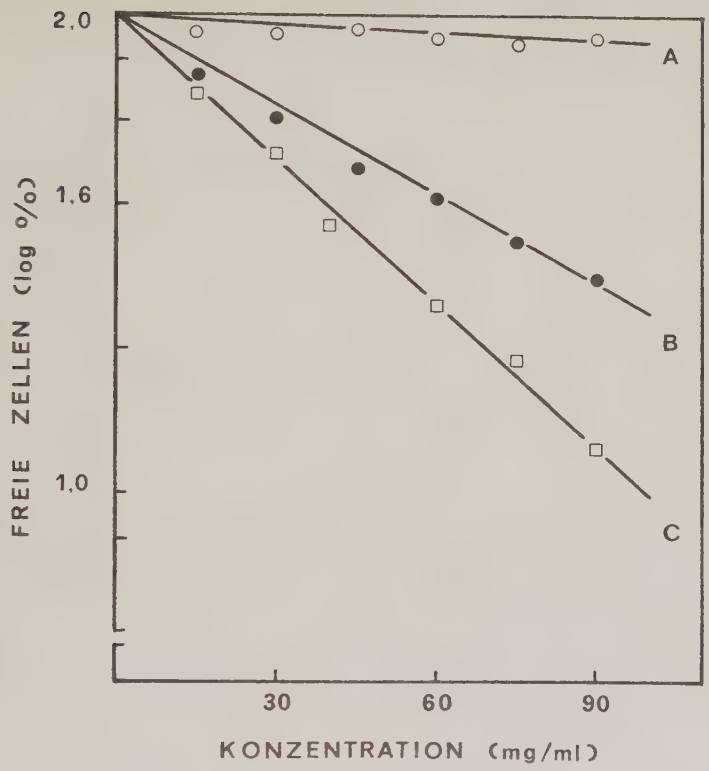

Abb. 13: Spezifische Zellbindung von S. marcescens HY an partikuläre Polyglucane.

Die Bindung von stationären, in M9 Glc-Medium gezüchteten Zellen an Bio Gel P2 (A), Sephadex G25 fine (B) und Stärkekörnern (C) wurde nach der in Abschnitt 2.7. beschriebenen Methode bestimmt.

Trocknung des Produktes wurde eine Gewichtszunahme von 2,5 % festgestellt. Der Azetylierungsgrad wurde nicht bestimmt. Die azetylierten Sephadexpartikel waren von den ursprünglichen mikroskopisch nicht zu unterscheiden.

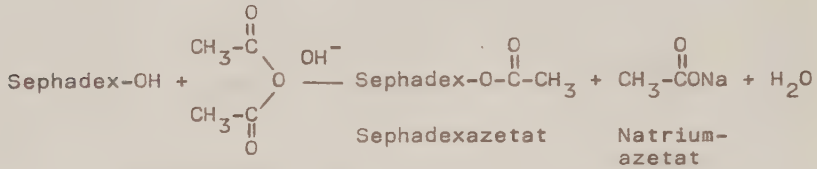

Abb. 14: Schema der Darstellung von Sephadexazetat.

- - -

Abb. 15a zeigt die Resultate von Bindeversuchen mit Sephadex G25 fine (I), hydroxypropyliertem (LH-Sephadex) (II) bzw. azetyliertem Sephadex G25 fine (III). In Abb. 15b sind die Ergebnisse von Bindeversuchen mit nativen Stärkekörnern (I), Stärkeaminether (II), Distärkephosphat (III) und azetyliertem Distärkephosphat (IV) aufgeführt. [a] Vergleicht man die bei Verwendung der verschiedenen Träger erhaltenen Kurven, ist deutlich zu erkennen, daß eine chemische Modifizierung der Trägersubstanzen zu einer starken Verminderung ihrer Bindekapazität führt. Dies bedeutet, daß auf Seiten des partikulären Trägermaterials sehr spezifische Strukturen bzw. Eigenschaften vorhanden sein müssen, wenn eine Zellbindung stattfinden soll.

3.1.5. Häufigkeit der Zellbindung an Sephadex G25 fine bei verschiedenen Wildstämmen

Um festzustellen, ob die Bindefähigkeit von S. marcescens HY an Sephadex ein verbreitetes Phänomen ist, oder ob sie sich

---

[a] Die nativen und die chemisch modifizierten Kartoffelstärkekörner wurden wie in Abschnitt 2.5. beschrieben mit P-Puffer gewaschen. Sie wurden jedoch nicht getrocknet.

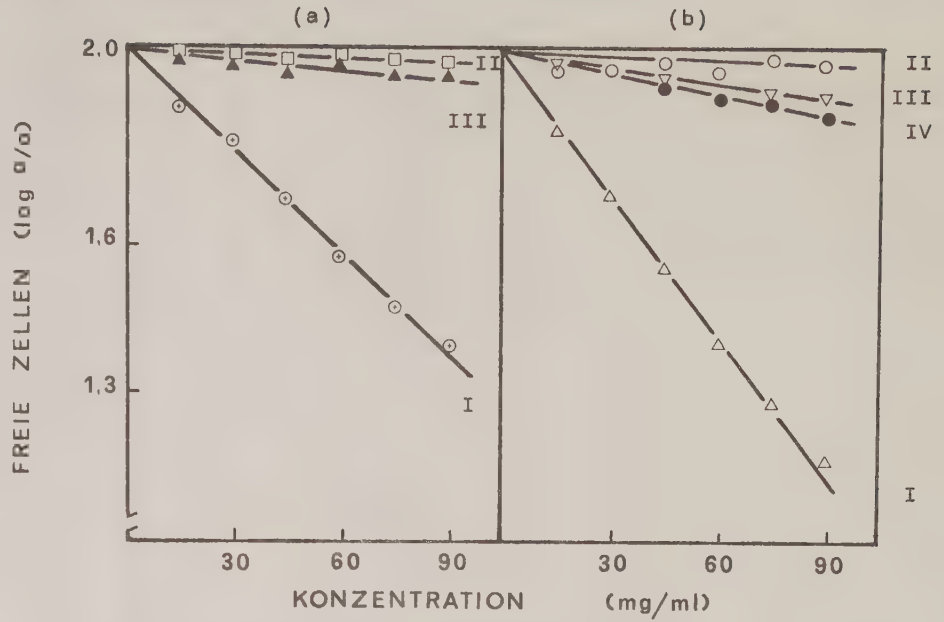

Abb. 15: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung stationärer Zellen von S. marcescens HY an verschiedene chemisch modifizierte Sephadex G25 fine- und Stärkesorten.

15a: ⊙—⊙ Sephadex G25 fine, □—□ hydroxypropyliertes Sephadex G25 fine, ▲—▲ azetyliertes Sephadex G25 fine.

15b: △—△ native Kartoffelstärkekörner, ○—○ Stärkeaminether, ▽—▽ Distärkephosphat, ●—● azetyliertes Distärkephosphat.

Die Zellbindung an den verschiedenen Trägern wurde nach der in Abschnitt 2.7. beschriebenen Methode bestimmt.

Stamm Nr.	Serotyp		Anteil gebundener Zellen (%)
	O	H	
HY (W 225)	nb	nb	54,2
W 1517	6	3	52,0
W 1518	4	4	12,9
W 1519	1	5	3,9
W 1528	2	1	19,5
W 1529	5	1	28,3
W 1531	8	3	6,4
W 1532	9	11	12,9
W 1534	11	nb	52,0
W 1538	15	8	8,4

Tab. 21: Bindung der Zellen von S. marcescens-Stämmen unterschiedlichen Serotyps (O-Antigen) an Sephadex G25 fine.

Die Zellbindung des Stammes HY wurde parallel als Kontrolle bestimmt. Der Bindetest fand unter den üblichen Bedingungen statt (siehe 2.7.).

- - -

auf einige wenige Stämme beschränkt, wurden verschiedene Serratia-Wildstämme untersucht.

3.1.5.1. Stämme von bekannten O-antigenen Serotypen

Die Zellbindung von 9 verschiedenen Serratia-Stämmen von bekannten O-antigenen Serotypen an Sephadex wurde bestimmt. Aus Tab. 21 ist ersichtlich, daß die Bindefähigkeit des Stammes HY kein Ausnahmeverhalten darstellt. Auch andere Serratia-Stämme sind bindefähig, wenn auch unterschiedlich stark.

Diese Ergebnisse zeigen, daß eine spezifische LPS-Struktur (O-Antigen) auf der Oberfläche der Bakterien für ihre Interaktion mit den Sephadexpartikeln wahrscheinlich

nicht erforderlich ist.

3.1.5.2. Frische Klinikisolate und alte Laborstämme

Untersuchungen zeigten, daß verschiedene Bakterienspezies, die an ihren natürlichen Standorten adhäsive Eigenschaften aufweisen, diese oft verlieren, wenn sie unter Laborbedingungen längere Zeit aufbewahrt werden (15,66,68). Costerton et al. stellten die Hypothese auf, daß der Adhäsionsvorgang lediglich eine Anpassungsfunktion darstellt, die für das Überleben der Bakterien an ihren natürlichen Standorten von Vorteil ist. Entfällt die Notwendigkeit einer Anpassung an unwirtliche Habitate, wie es bei künstlichen Lebensbedingungen im Labor der Fall ist, so verlieren die Bakterien mit der Zeit ihre dann nicht mehr erforderlichen adhäsiven Eigenschaften (15).

Deshalb wurde untersucht, ob Unterschiede zwischen frischen Klinikisolaten und alten Laborstämmen von S. marcescens hinsichtlich ihrer Zellbindung an Sephadex G25 fine bestehen. S. marcescens HY, das Versuchsobjekt dieser Arbeit, ist seit mindestens 20 Jahren ein Laborstamm (Winkler, pers. Mitteilung). Die Ergebnisse des Bindetests ergaben keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen beiden Gruppen von Bakterienstämmen (siehe Tab. 22).

3.2. Isolierung und Charakterisierung bindedefekter Bakterienmutanten

Die äußere Membran Gram-negativer Bakterien stellt eine Permeationsbarriere für viele Substanzen dar. S. marcescens weist eine hohe Resistenz gegenüber Natriumdodecylsulfat (SDS) auf (90). In dieser Arbeit sollten zunächst Mutanten von S. marcescens HY isoliert werden, deren Wachstum durch das Detergenz SDS stark gehemmt wird. Diese Mutanten sind sehr wahrscheinlich in ihrer äußeren Membran defekt. Danach sollte geklärt werden, ob diese SDS-hypersensiblen Klone Veränderungen in ihrem Bindeverhalten aufweisen.

Frische Klinikstämme		Alte Laborstämme	
Stamm Nr.	Anteil gebundener Zellen (%)	Stamm Nr.	Anteil gebundener Zellen (%)
W 1766	44,3	W 244	48,1
W 1767	52,3	W 225 (HY)	50,7
W 1768	19,8	W 272	35,0
W 1769	25,9	W 1113	50,1
W 1770	55,5	W 1128	3,5
W 1771	31,0	W 1659	8,0
W 1772	0,0	W 1684	18,3
W 1773	62,7	W 1694	40,4

Tab. 22: Zellbindung frischer Klinik- und alter Laborstämme von S. marcescens an Sephadex G25 fine. Der Bindetest fand unter den üblichen Bedingungen statt (siehe 2.7.).

3.2.1. Isolierung und Bindeverhalten der Mutanten

Logarithmische Kulturen von S. marcescens HY wurden mit NG nach der Methode von Winkler et al. (91) mutagenisiert (siehe 2.13.). Durch die Behandlung wurden 32 % der Zellen inaktiviert. Die mutagenisierten Zellen wurden zunächst auf NB-Agarplatten gespatelt, um die Segregation der Mutanten zu ermöglichen. Nach 48 h Bebrütung wurden die Kolonien auf M9 Glc-Agarplatten überstempelt, die 0,25 % SDS enthielten. Aus 4128 übertragenen Kolonien wurden 30 Klone isoliert, die nicht oder nur schlecht auf den SDS-haltigen Agarplatten gewachsen waren. Drei der 30 Klone waren auxotrophe Mutanten, da sie unfähig waren, sich in M9 Glc-Medium zu vermehren. Diese Klone wurden nicht in die Untersuchung miteinbezogen. In M9 Glc-Medium gezüchtete Ü-Kulturen der restlichen 27 Klone sowie des Wildtyps HY wurden mit P-Puffer gewaschen und im Bindetest eingesetzt (siehe 2.5. und 2.7.). Drei der 27 untersuchten SDS-empfindlichen Mutanten zeigten ein gestörtes Bindeverhalten. Von diesen Mutanten wurden insbesondere die Stämme K9 und K28 im Verlauf der weiteren Arbeit näher untersucht. Beide bindedefekten Mutanten sind unabhängig voneinander entstanden. Sie bilden auf NB-Agarplatten hellrosa Kolonien.

Das Bindeverhalten der Mutanten K9 und K28 wurde mit dem des Wildtyps verglichen (Abb. 16). Bei einer Konzentration von 90 mg Sephadex G25 fine/ml waren etwa 75 % der eingesetzten Wildtypzellen gebunden. Unter gleichen Bedingungen konnten sich die Zellen der Mutanten K9 und K28 jedoch nur zu 11 bzw. 23 % an die Sephadexpartikel anheften.

3.2.2. Wuchskinetik und Bindefähigkeit der Mutante K28

Um festzustellen, ob die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante K28 hinsichtlich ihrer Bindefähigkeit an Sephadex von der Wuchsphase der Zellen bedingt werden, wurde folgender Versuch durchgeführt: Je 3 x 20 ml M9 Glc-Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben wurden mit einer in M9 Medium (ohne C-Quelle) resuspendierten Ü-Kultur der Mutante K28 bzw. des Stammes HY angeimpft (Extinktion ca. 6,5 UK). Die Kulturen

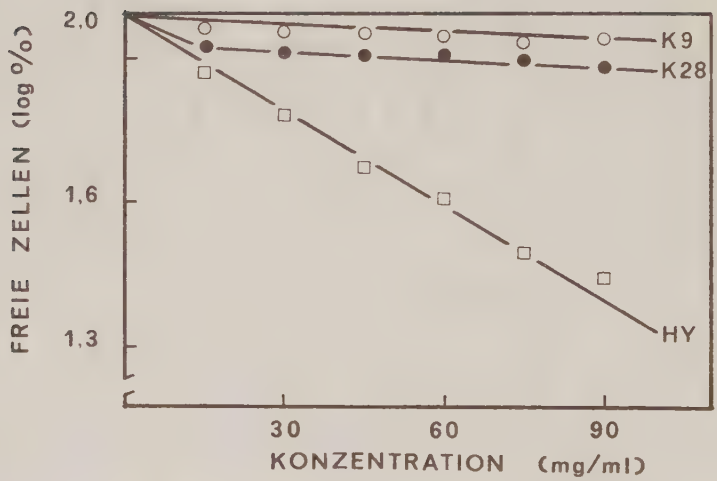

Abb. 16: Zellbindung der Mutanten K9 und K28 sowie des Wildtyps HY an Sephadex G25 fine.

wurden in einem Schüttelwasserbad (Stufe 5) bei 30°C inkubiert. Durch Bestimmung der Extinktion (OD_{Klett}) der Kulturen wurde ihr Wachstum verfolgt. Zu verschiedenen Zeiten (2,5, 5,0, 7,5, 10, 24 h) wurden Proben entnommen und die Zellen auf ihre Bindefähigkeit an Sephadex G25 fine untersucht (siehe 2.7.).

In Abb. 17 wurde der Logarithmus der Zelldichte (N) bzw. der Zellbindung gegen die Inkubationsdauer aufgetragen. Die Wuchskurven der Mutante K28 und des Wildtyps HY verliefen fast identisch. Nach 24 h Bebrütung erreichten beide Kulturen einen Zelltiter von ca. 6,3 x 10^9/ml. Hinsichtlich ihrer Bindeeigenschaften unterschieden sich Mutante und Wildtyp jedoch stark voneinander (siehe gestrichelte Kurven). Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde der Anteil gebundener Zellen des Wildtyps nach 2,5 h Bebrütung einer 100 %igen Zellbindung gleichgesetzt. Alle anderen Bindewerte beziehen sich auf diesen Wert.

3.2.3. SDS-Empfindlichkeit der Mutanten

Detergenzien scheinen sogar bei sehr niedrigen Konzentrationen an biologische Membranen zu binden (48). Diese Bindung kann sowohl geringe als auch starke Veränderungen (Membranen- und Zell-Lyse) in der Durchlässigkeit der Membranen verursachen (48). In der verwendeten Konzentration von 0,25 % hemmt SDS das Wachstum der bindedefekten Mutanten K9 und K28. Um zu untersuchen, ob eine Behandlung der Mutanten mit SDS eine Zell-Lyse verursacht, wurden gleiche Volumina von Zellsuspensionen der Mutanten K9 und K28 sowie des dazugehörigen Wildtyps HY (in P-Puffer) mit einer 0,5 %igen SDS-Lösung (in P-Puffer) bei 30°C vermischt. Die Extinktion (OD_{Klett}) der sich daraus ergebenden Zellsuspensionen betrug in allen drei Fällen 70 UK. Vor Versuchsbeginn wurden die verschiedenen Zellsuspensionen und die SDS-Lösung 10 min bei 30°C vorgewärmt. Die Trübung der Zellsuspension der Mutante K9 nahm durch die SDS-Behandlung rasch ab. Nach 10 min Inkubation ging ihre Extinktion auf etwa 10 % zurück. Die Extinktion der Kultur der Mutante K28 sowie die des Wildtyps

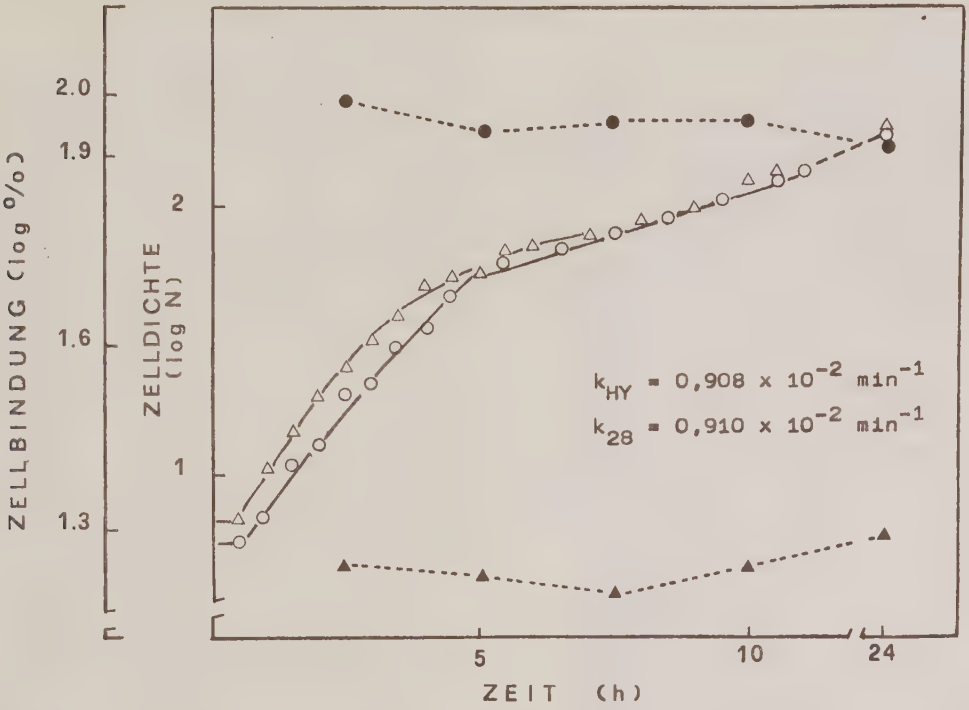

Abb. 17: Wuchsverhalten und Zellbindefähigkeit der Stämme HY (○———●) und K28 (△———▲) an Sephadex G25 fine.

k = Vermehrungskonstante, berechnet nach den entsprechenden Zelldichten zwischen 1,5 und 2,5
Die Bestimmung der Zellbindung der M9 Glc-Kulturen an Sephadex G25 fine erfolgte nach der in Abschnitt 2.7. beschriebenen Methode.
Zellbindung = (----), Zelldichte = (———).

blieben dagegen fast unverändert (siehe Abb. 18). Eine mikroskopische Untersuchung der verschiedenen Zellsuspensionen nach der SDS-Behandlung ergab, daß die Mehrheit der Zellen des Stammes K9 tatsächlich lysiert waren. Die wenigen unversehrt gebliebenen Zellen bildeten unförmige Klumpen. Die Zellen des Wildtyps HY bzw. der Mutante K28 wiesen dagegen keine mit dem Lichtmikroskop festzustellende Veränderungen auf.

Diese Ergebnisse bestätigen, daß K9 und K28 Mutanten verschiedenen Ursprungs sind, und lassen vermuten, daß ihre äußeren Membranen durch die Mutation auf verschiedene Weise oder in unterschiedlichem Ausmaß verändert wurden.

3.2.4. Aussehen der Mutanten im Elektronenmikroskop

Viele Enterobakterien haben auf ihren Zelloberflächen haarähnliche proteinöse Anhänge, sogenannte Fimbrien oder Pili. In einigen Fällen werden diese Strukturen als Adhäsionsorganelle betrachtet (73). Bakterielle Fimbrien werden im allgemeinen elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Deshalb wurden Zellen von S. marcescens HY sowie der Mutanten K9 und K28 im Elektronenmikroskop untersucht. Das Fehlen von Fimbrien bei den bindedefekten Mutanten wäre ein Hinweis auf die Beteiligung dieser Strukturen an der Zellbindung an Sephadex.

Frühstationäre M9 Glc-Kulturen der Stämme HY, K9 und K28 wurden fixiert, auf Objektträgernetze aufgetragen und kontrastiert (siehe 2.14.). Die Präparate wurden dann elektronenmikroskopisch untersucht. Die Kultur des Stammes HY sowie die der Mutante K9 bzw. K28 setzten sich aus Zellen verschiedener Phänotypen zusammen. Die Mehrheit der Zellen aller drei Stämme wies auf ihrer Oberfläche peritrich angeordnete Fimbrien auf, die miteinander zu interagieren schienen (Abb. 19). Von 100 Zellen, die sich in einem Netzquadrat befanden, hatten drei andersgeartete Fimbrien, deren Struktur nicht eindeutig definierbar war (Abb. 20). Weitere 4 besaßen keine Fimbrien. Hinsichtlich ihrer Fimbriation wur-

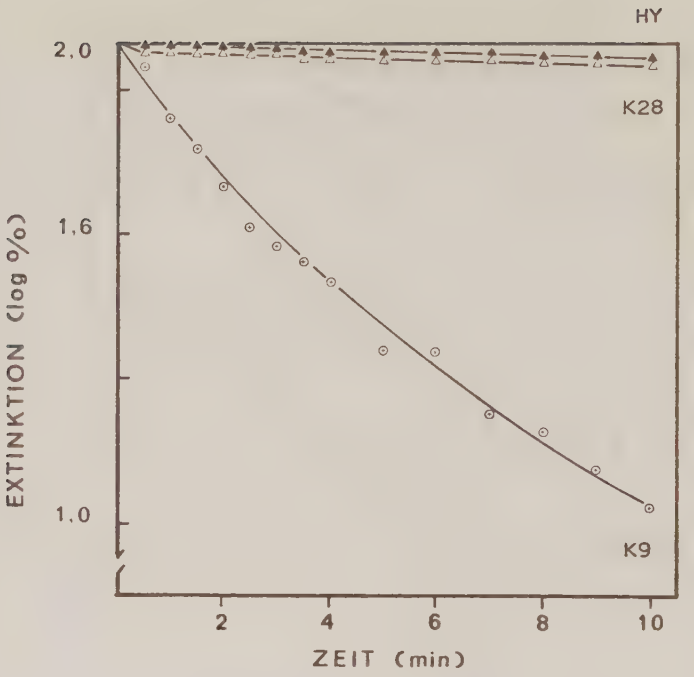

Abb. 18: Natriumdodecylsulfat (SDS)-Empfindlichkeit der bindedefekten Mutanten K9 und K28 sowie des Wildtyps HY.

Die Abnahme der Extinktion (OD_{Klett}) einer stationären M9 Glc-Kultur der entsprechenden Bakterienstämme wurde unmittelbar nach der Zugabe von SDS (Endkonzentration = 0,25 % w/v) und dann in kurzen Zeitabständen bestimmt.

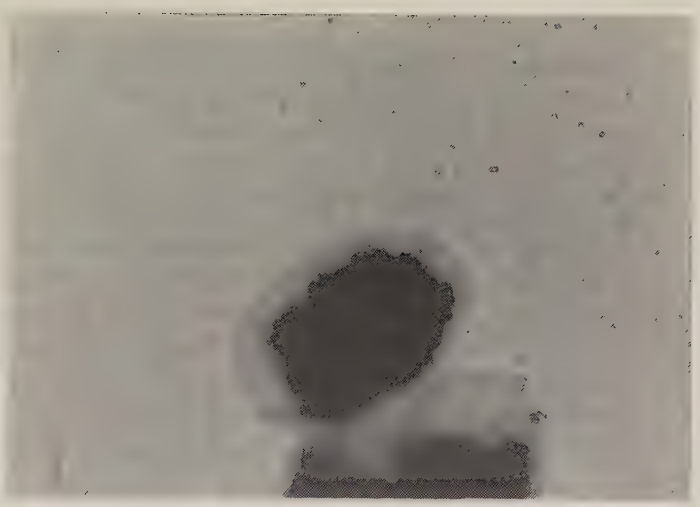

Abb. 19: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines bedampften Präparates frühstationärer Zellen von Serratia marcescens HY: "Normale Fimbrien". 40 000 x.

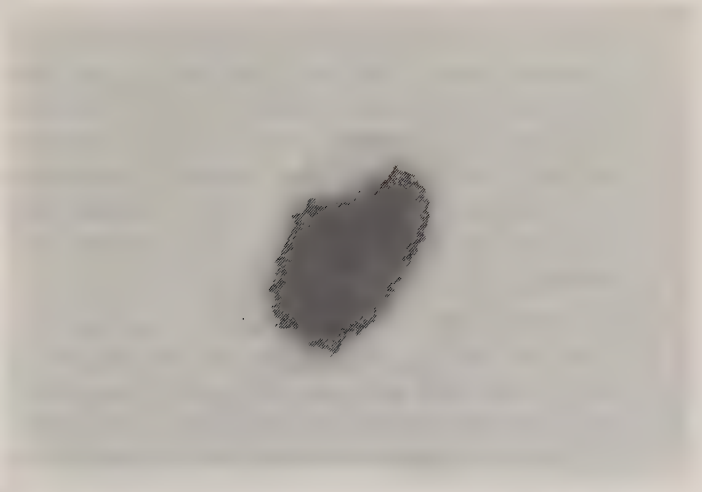

Abb. 20: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines bedampften Präparates frühstationärer Zellen von Serratia marcescens HY: "Ungewöhnlich aussehende Fimbrien". 40 000 x.

den keine Unterschiede zwischen den Zellen der bindedefekten Mutanten und denen des Wildtyps festgestellt. Aufgrund der hohen Dichte der "normalen" Fimbrien konnte nicht geklärt werden, ob die Mehrheit der Zellen zusätzlich die in Abb. 20 sichtbaren Strukturen bildeten.

Ein elektronenmikroskopisches Bild der Wildtyp-Zellen (Abb. 19) wurde mittels eines Projektors auf weißes Papier übertragen. Die Länge der Fimbrien wurde mit einem Kurvenrad durch Abfahren der vergrößerten Fimbrien bestimmt. Die ermittelte Fimbrienlänge variierte zwischen 0,28 und 1,4 μm. Die Häufigkeitsverteilung der Länge von 48 vermessenen Fimbrien zeigte einen ausgeprägten Gipfel in einem Bereich von 0,56 - 0,7 μm (siehe Abb. 21). Der mittlere Durchmesser der Fimbrien kann nicht exakt angegeben werden, da es sich um bedampfte Präparate handelte; er liegt aber gewiß unter 7 nm. Aufgrund der großen Anzahl von Fimbrien pro Zelle war ihre Insertion an der Zelloberfläche nicht immer sicher erkennbar, sodaß die sehr langen Fimbrien ($>$0,84 μm) eventuell von den Zellen abgelöst waren und eigentlich eine "normale" Länge (0,56 - 0,7 μm) aufwiesen. Da für diese Untersuchung frühstationäre Zellen verwendet wurden, ist nicht auszuschließen, daß ein Teil der vermessenen kurzen Fimbrien ($<$0,42 μm) noch im Stadium ihrer Bildung erfaßt wurden. Andere Interpretationen wären: a) ein Teil der Fimbrien ist bei der Vorbereitung der Präparate abgebrochen; b) ein Teil der Fimbrien ist nicht am "Rand" der Bakterien inseriert, sondern nur in "Randnähe" oberhalb bzw. unterhalb der Bildebene.

Die Elektronenmikroskopie ermöglichte den Nachweis von Fimbrien bei S. marcescens HY. Die Annahme, daß die Mutanten K9 und K28 aufgrund fehlender Fimbrien weniger effektiv an Sephadex binden als der Wildtyp, trifft jedoch nicht zu, da beide bindedefekten Mutanten Fimbrien besitzen. Über 90 % der Zellen aller drei untersuchten Stämme hatten zahlreiche Fimbrien auf ihrer Oberfläche. Zumindest zwei verschiedene Fimbrien-Typen wurden eindeutig identifiziert. Es ist aber möglich, daß noch weitere, nicht erkannte Typen gebildet werden.

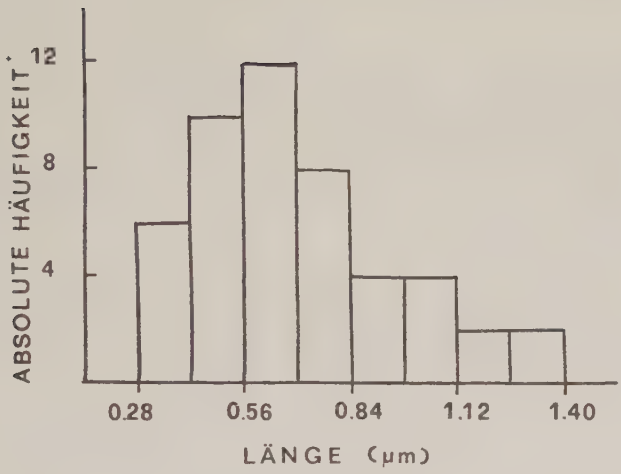

Abb. 21: Häufigkeitsverteilung (Histogramm) der Länge von Fimbrien des Stammes HY.

*Anzahl gemessener Fimbrien.

Polysaccharid	Zellagglutination [a]		
	Wildtyp HY	Mutante K9	Mutante K28
Alginat (Na)	+	+	+
Chondroitinsulfat (Na)	++	++	++
Dextran T70	+	+	+
Dextran T2000	+	+	+
Gummi arabicum	+	+	+
Hyaluronat (K)	++	++	++
Laminarin	+	+	+
Polygalakturonat (Na)	±	±	±
Pullulan	++	++	++

Tab. 23: Agglutinierbarkeit von Zellen der Mutanten K9 und K28 sowie des Wildtyps HY durch verschiedene Polysaccharide.

Die Polysaccharidkonzentration im Agglutinationstest betrug 0,4 % (w/v) (siehe 2.8.).

[a] Bewertung: ± = ungewiß, + = feine Agglutination, ++ = grobe Agglutination.

- - -

3.2.5. Agglutinierbarkeit der Mutanten durch gelöste Polysaccharide

S. marcescens HY interagiert nicht nur mit partikulären, sondern auch mit gelösten Polysacchariden (siehe 3.1.3.4.); im letzteren Fall agglutinieren die Zellen. Mit dem folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob Zellen der bindedefekten Mutanten K9 und K28 durch Zugabe bestimmter Polysaccharide noch agglutinieren können. Für den Versuch wurden stationäre M9 Glc-Kulturen der Mutanten bzw. des Wildtyps sowie Lösungen der verschiedenen Polysaccharide (in P-Puffer) verwendet. Polygalakturonat wurde durch Erhitzen auf 100°C (10 min) gelöst. Die Agglutinierbarkeit der Zellen durch verschiedene Polysaccharide wurde nach der in Abschnitt 2.8. beschriebenen Methode bestimmt. Die Poly-

saccharidkonzentration im Agglutinationstest betrug 0,4 % (w/v).

Die Zellen beider bindedefekten Mutanten agglutinierten durch die verwendeten Polysaccharide ebenso wie die des Wildtyps (siehe Tab. 23). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das Agglutinationsphänomen und die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex zumindest auf zellulärer Seite verschiedene strukturelle Voraussetzungen haben.

3.2.6. Extrazelluläre Enzymaktivitäten der Mutanten

Stationäre Kulturen der bindedefekten Mutanten K9 und K28 sowie des Wildtyps HY wurden unter Verwendung von M9 Glc- bzw. YP-Medien angezogen. Nachdem die Extinktion (OD_{580}) der Kulturen bestimmt worden war, wurden die Kulturüberstände gewonnen (siehe 2.5.). Die YP-Kulturen aller drei Stämme erreichten eine etwa 3,4 Mal höhere Zelldichte als die entsprechenden M9 Glc-Kulturen.

Die Lipase-, Protease- und Nuclease-Aktivitäten der verschiedenen Überstände wurden mit Hilfe der entsprechenden Enzymtests bestimmt (siehe 2.17.). Um die Enzymaktivitäten miteinander vergleichen zu können, wurden alle Meßwerte auf eine einheitliche, sich auf die ursprünglichen Kulturen beziehende Zelldichte (OD_{580} = 1,0) umgerechnet.

In den Kulturüberständen der bindedefekten Mutante K28 war eine höhere Lipase- und Nuclease-Aktivität als in denen des Wildtyps HY nachweisbar (siehe Tab. 24). Während die Lipase-Aktivität des Stammes K28 im M9 Glc-Überstand etwa 2,7 Mal höher war als im entsprechenden YP-Überstand, wurde im YP-Überstand eine etwa 4,1 Mal höhere Nuclease-Aktivität als im M9 Glc-Überstand festgestellt. Letztere Aktivität war nur unwesentlich höher als die des Wildtyps im M9 Glc-Überstand. Die extrazelluläre Protease-Aktivität von K28 erreichte in den M9 Glc- und YP-Kulturen etwa den gleichen Wert wie in den entsprechenden Kulturen des Wildtyps. Die bindedefekte Mutante K9 verhielt sich hinsichtlich aller extrazellulären Enzymaktivitäten analog dem Wildtyp HY.

Stamm	Extrazelluläre Enzymaktivitäten (EU)					
	Lipase ($\times 10^{-3}$)		Protease ($\times 10^{-3}$)		Nuclease ($\times 10^{-3}$)	
	a)	b)	a)	b)	a)	b)
HY	16,3	15,7	8,8	1,9	1,41	0,82
K9	16,1	16,0	8,8	1,7	1,69	0,79
K28	72,0	26,0	9,0	2,0	1,80	7,40

Tab. 24: Extrazelluläre Enzymaktivitäten der bindedefekten Mutanten K9 und K28 sowie des Wildtyps HY.

Die Lipase-, Protease- und Nuclease-Aktivitäten der Überstände von stationären Kulturen der entsprechenden Bakterienstämme wurden nach den im Abschnitt 2.17. beschriebenen Tests bestimmt.

a) Enzymaktivitäten von M9 Glc-Kulturen
b) Enzymaktivitäten von YP-Kulturen

- - -

3.3. Die Fimbrien von S. marcescens HY und Mutante K28

Sowohl der Wildtyp HY als auch die Mutante K28 besitzen auf ihrer Zelloberfläche Fimbrien (siehe 3.2.4.). Da jedoch die Möglichkeit bestand, daß die Mutation eine Veränderung der Aminosäurezusammensetzung des Fimbrien-Proteins bewirkt, die zwar das Aussehen der Fimbrien nicht beeinträchtigt, wohl aber einen Einfluß auf ihre adhäsiven Eigenschaften ausübt, sollten zunächst Fimbrien beider Bakterienstämme isoliert und gereinigt werden. Wenn nun die gereinigten Fimbrien des Wildtyps, nicht aber die der Mutante, in der Lage sein würden, die normale Zellbindung an Sephadex zu hemmen, wäre das ein direkter Nachweis für die Beteiligung dieser Strukturen am Adhäsionsvorgang.

3.3.1. Isolierung und Reinigung der Fimbrien

Zur Isolierung von Fimbrien wurden Kulturen des Stammes HY bzw. der Mutante K28 in 6000 ml M9 Glc-Medium angezogen (siehe 2.15.). Unter den gewählten Anzuchtbedingungen erreichte die Kultur des Stammes HY eine höhere Zelldichte als die der Mutante K28 (OD_{580} = 1,51 bzw. 1,21). Die Kulturen wurden gewaschen, und die durch Zentrifugation gewonnenen Zellsedimente anschließend in P-Puffer aufgenommen. Um die Fimbrien von den Zellen abzulösen, wurden die Zellsuspensionen zunächst auf 4°C abgekühlt und dann mit einem Waring blendor behandelt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Temperatur der Kulturen während der Behandlung 10°C nicht überstieg. Vor und nach der Behandlung wurden die Extinktion (OD_{580}) und der Zelltiter (Neubauer-Zählkammer) der Bakteriensuspensionen bestimmt, um zu kontrollieren, ob eine Zell-Lyse auftrat. Die defimbrierten Bakterien wurden abzentrifugiert und der Überstand wurde abgekühlt. Nach Resuspension der Zellsedimente in P-Puffer wurde die Zellsuspension im Bindetest eingesetzt. Die Untersuchung ergab, daß die Zellen des Wildtyps HY nach der Waring blendor-Behandlung ihre Bindeeigenschaften vollkommen verloren hatten. Durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis zu einem Sättigungsgrad von 50 % wurde ein Teil der im Überstand enthaltenen Proteine ausgefällt. Der Ansatz blieb über Nacht bei 4°C stehen. Die Mehrheit der ausgefällten Proteine aus den Überständen beider Stämme schwammen auf der Oberfläche der Flüssigkeit. Ähnliche Beobachtungen machten Frost und Paranchych bei der Isolierung von Fimbrien des Bakteriums Pseudomonas aeruginosa K (34). Während jedoch bei dem Überstand des Wildtyps HY unter dem Präzipitat eine klare Lösung zu erkennen war, zeigte sich die Lösung des Überstandes der Mutante trüb. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß eine zusätzliche Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einem Sättigungsgrad von 80 % zu einer weiteren Fällung von Proteinen führte, die sich innerhalb einiger Stunden auf dem Boden des Kolbens absetzten. Deshalb wurde in der Aufarbeitung auf eine nochmalige Fällung verzichtet. Durch Zentrifugation der

gefällten Ansätze wurde ein weißes, opaleszierendes Präzipitat gewonnen. Die Präzipitate von Wildtyp und Mutante wurden in jeweils 7,5 ml P-Puffer aufgenommen. Eine lichtmikroskopische Untersuchung ergab, daß in den Proteinlösungen noch Bakterien enthalten waren. Nachdem diese durch wiederholtes Zentrifugieren entfernt worden waren (10 min, 2442 x g, SZ-Rotor SS34), wurden die Lösungen extensiv gegen P-Puffer dialysiert. Die sich daraus ergebenden Proteinlösungen wurden als "Rohmaterial" bezeichnet. Der Proteingehalt des Rohmaterials des Stammes HY und der Mutante K28 wurde nach den Methoden von Lowry et al. (59) und Bradford (06) bestimmt. Die bei Verwendung der Methode von Bradford erhaltenen Werte entsprachen nur etwa 46 % der jeweiligen Werte, die sich bei Verwendung der Methode von Lowry et al. ergaben. Dieser Unterschied beruht wahrscheinlich auf einer unvollständigen Denaturierung der Fimbrien bei der von Bradford entwickelten Methode. In allen folgenden Proteinbestimmungen wurde deshalb nur die Methode von Lowry et al. verwendet.

Zur Untersuchung der UV-Absorptionsspektren der Rohmaterialien dienten Proben mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml. Das UV-Absorptionsspektrum des Rohmaterials des Wildtyps zeigte ein für Proteine charakteristisches Absorptionsmaximum bei 277 nm, das der Mutante K28 wies dagegen kein ausgeprägtes Maximum auf (siehe Abb. 22). Dieser Umstand deutet eventuell auf einen niedrigeren molaren Anteil an aromatischen Aminosäuren im Mutanten-Protein.

Um die hochmolekularen Fimbrien von Verbindungen niedrigeren Molekulargewichts zu trennen, wurde das Rohmaterial des Stammes HY und der Mutante K28 einer Gel-Filtration (Bio Gel A50m) unterzogen. Die Extinktion (OD_{280}) und der Kohlenhydratgehalt (siehe 2.16.1.) der Fraktionen wurden bestimmt. Abb. 23 zeigt die Elutionsdiagramme des Stammes HY (Abb. 23a) und der Mutante K28 (Abb. 23b). Die Fraktionen der einzelnen Gipfel wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer bei 37°C eingeengt (Endkonzentration = 1 mg Protein/ml). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung der

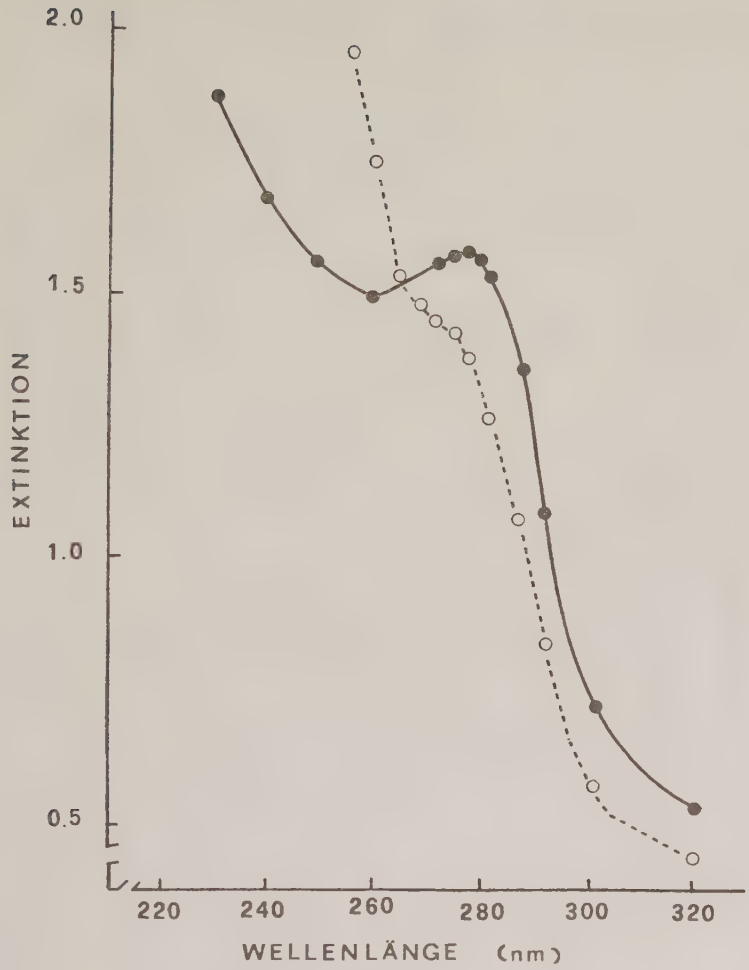

Abb. 22: UV-Absorption des Rohmaterials.

●—● HY

○--○ K28

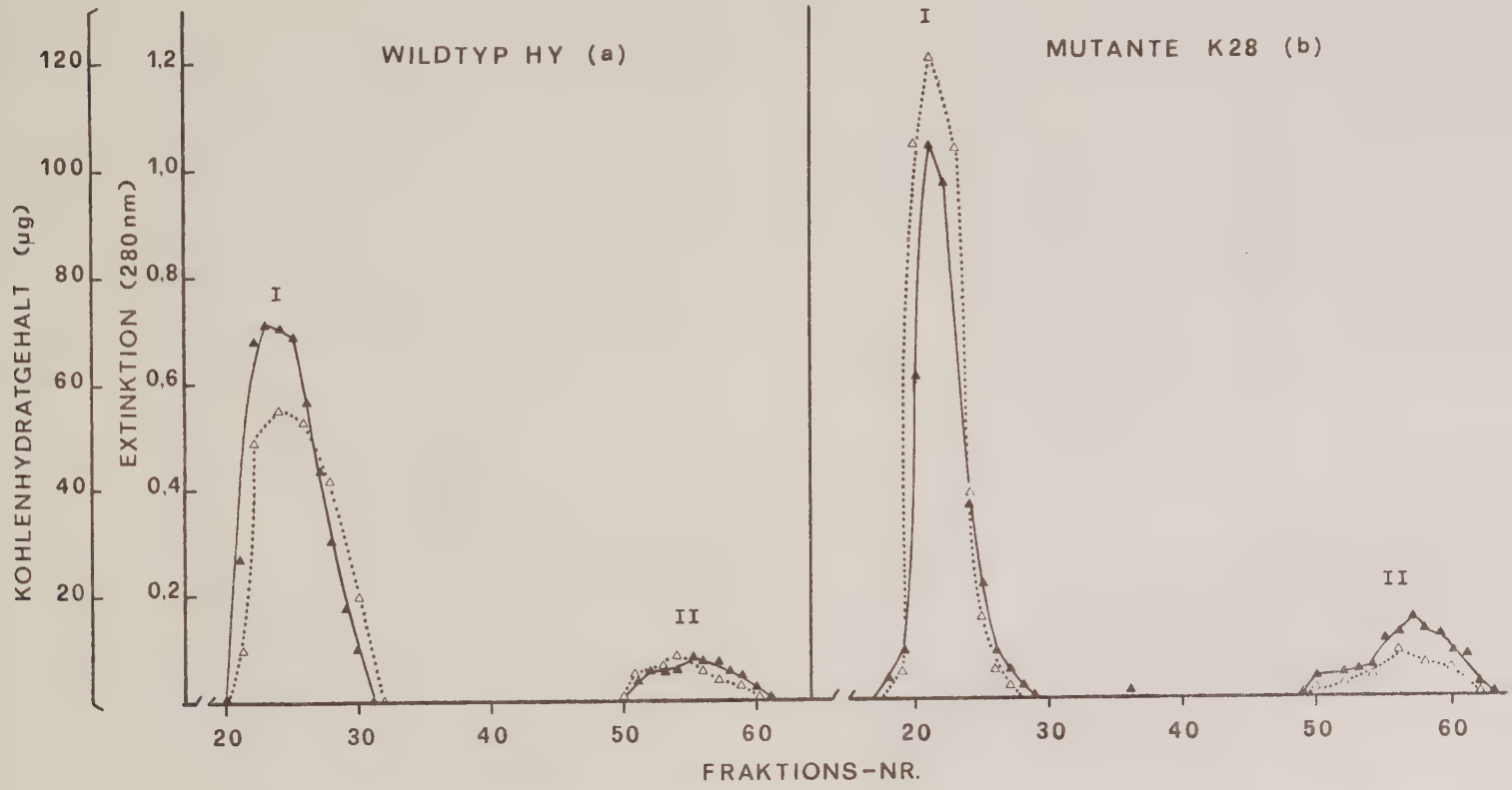

Abb. 23: Bio Gel A50m-Gel Filtration des Rohmaterials.

Der Kohlenhydratgehalt der Fraktionen wurde nach der Methode von Dubois et al. ( ) bestimmt.

▲—▲ OD_{280} △·····△ Kohlenhydratgehalt Fraktions-Volumen: 2,15 ml

konzentrierten Eluate bestätigte, daß die Fimbrien erwartungsgemäß im Ausschlußvolumen der Säule (38,7 ml) enthalten waren (Gipfel I).

In den Fimbrien-enthaltenden Fraktionen, die durch Gel-Filtration der Rohmaterialien des Stammes HY und der Mutante K28 gewonnen worden waren, wurden 3,65 mg bzw. 3,40 mg Protein bestimmt. Beide Fimbrienlösungen wiesen ein Absorptionsmaximum bei 277 nm auf. Ihr Kohlenhydratgehalt wurde nach der Methode von Dubois et al. (18) ermittelt. Er betrug für beide Lösungen 0,42 mg, d.h. etwa 10 % der Gesamtmasse. Der Nachweis von 2-Keto-3-Desoxyoktulonat (KDO), einer Komponente der Lipopolysaccharide, in den Fimbrien-enthaltenden Fraktionen verlief negativ. KDO wurde jedoch in dem Eluat festgestellt, daß sich aus den Fraktionen 48 - 62 zusammensetzte (Gipfel II). In diesen Fraktionen befanden sich keine Fimbrien.

Tab. 25 zeigt die Bilanz der Aufarbeitung von 5985 ml M9 Glc-Kultur zur Isolierung von Fimbrien des Stammes HY bzw. der Mutante K28. Für die Betrachtung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß die Extinktion (OD_{580}) der ursprünglichen Kulturen unterschiedlich war.

Bei einer Wiederholung des Versuches ergab sich nach der Gel-Filtration des Rohmaterials von S. marcescens HY im Ausschlußvolumen ein kleinerer Gipfel, während Gipfel II erheblich größer ausfiel (siehe Abb. 24). Da der Titer der Zellsuspension nach der Waring blendor-Behandlung etwas geringer war als vor der Behandlung, und da das Eluat, das dem zweiten Gipfel entsprach, ein Absorptionsmaximum bei 258 nm aufwies, könnte die Vergrößerung des zweiten Gipfels auf eine Verunreinigung mit Nukleinsäuren zurückzuführen sein. Der Rückgang des ersten Gipfels könnte durch eine geringere Anzahl von Fimbrien pro Zelle als in dem zuerst geschilderten Versuch erklärt werden. Diese Präparate wurden nicht weiter verwendet.

Die nach der Gel-Filtration konzentrierten Fimbrienpräparate des Stammes HY und der Mutante K28 wurden in

Ausbeute an →	Protein [a] (mg)	Kohlenhydrat [b] (mg)	2-Keto-3-Desoxyoktulonat [c] (mg)
nach Waring blendor Behandlung			
HY	25,80	53,20	5,80
K28	14,00	42,70	5,40
nach $(NH_4)_2SO_4$ Fällung (50 % Sättigungsgrad) und Dialyse			
HY	8,32	0,89	0,31
K28	6,24	0,67	0,42
nach Gel-Filtration (Bio Gel A50m)			
HY	7,30 (3,65)	0,85 (0,42)	-
K28	5,10 (3,40)	0,63 (0,42)	-

Tab. 25: Aufarbeitung von M9 Glc-Kulturen des Wildtyps HY bzw. der Mutante K28 zur Isolierung von Fimbrien.

Die Werte in Klammern entsprechen den Protein- bzw. Kohlenhydradkonzentrationen der Eluate nach der Gel-Filtration, da nur 1/2 des Rohmaterials des Stammes HY bzw. 2/3 des Rohmaterials der Mutante K28, d.h. jeweils 4,1 mg, auf die Säule aufgetragen wurden.

[a] nach Lowry et al. (59)
[b] nach Dubois et al. (18)
[c] nach Karkhanis et al. (52)

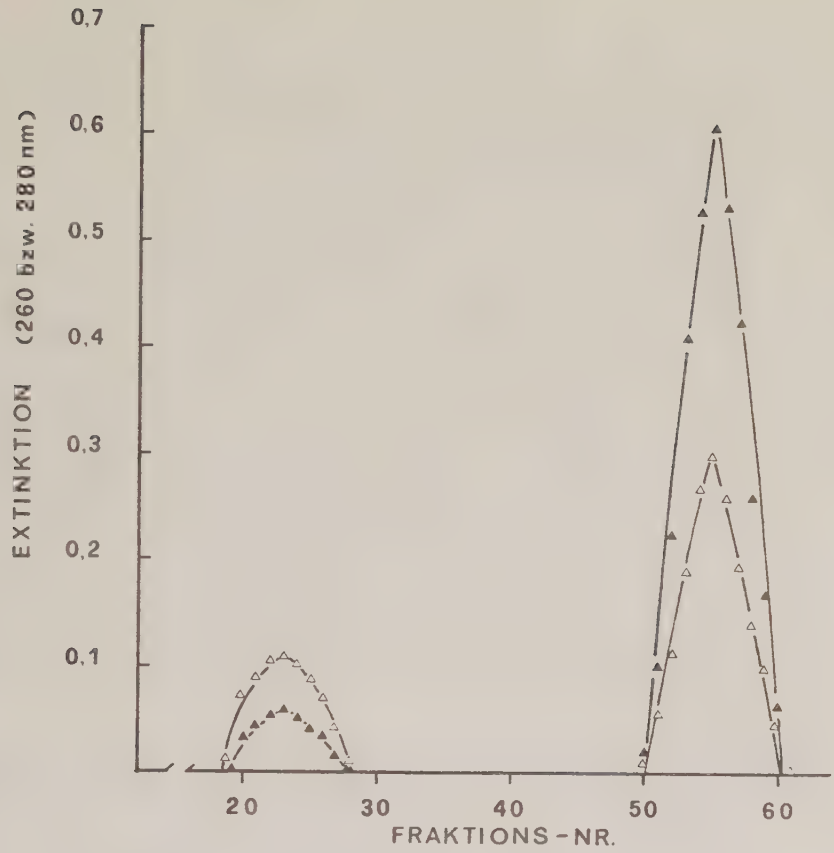

Abb. 24: Bio Gel A50m-Gel Filtration des Rohmaterials von S. marcescens HY.

▲—▲ OD_{260}

△—△ OD_{280}

Fraktions-Volumen: 2,15 ml

12,5 %igem Acrylamid-Gel elektrophoriert. Die Anwendung dieser Methode führte zu erheblichen Schwierigkeiten. Nach der Anleitung von Frost und Paranchych (34) hat die Denaturierung der Fimbrien von P. aeruginosa K 5 min bei 100°C in Anwesenheit von 0,2 % SDS und 0,02 % Dithiothreitol zu erfolgen. Derartige Versuchsbedingungen ergaben aber nach der Färbung der Gele mit Coomassie Blue keinerlei Ergebnisse, d.h. es wurden keine Banden sichtbar. Wurde die Konzentration von SDS und Dithiothreitol erhöht (2 % bzw. 0,2 %) und die Inkubationszeit verlängert (10 min), zeigte sich eine Bande am unteren Ende des Gels. Da aber die Hauptbande nur schwach sichtbar war, konnte keine sichere Aussage über den Reinheitsgrad der Präparate gemacht werden. Die Fimbrien (Pili-Typ 1) von E. coli sind sehr resistent gegen eine Auflösung durch SDS (63); daher ist es ziemlich schwer zu erreichen, daß sie in das Acrylamid-Gel eindringen. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß die Fimbrien von S. marcescens HY bzw. der Mutante K28 durch die Behandlung nicht oder nur teilweise in ihre Untereinheiten aufgespalten wurden.

3.3.2. Hemmung der Zellbindung an Sephadex G25 fine durch Fimbrienpräparate

Um zu untersuchen, ob die gereinigten Fimbrien des Stammes HY bzw. der Mutante K28 in der Lage sind, die normale Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex kompetitiv zu hemmen, wurden sie im Bindetest eingesetzt (siehe 2.7.). Die Ergebnisse des Experimentes sind in Abb. 25 wiedergegeben. Bei gleicher Proteinkonzentration zeigte das Fimbrienpräparat des Stammes HY eine stärkere Hemmwirkung als das der Mutante K28. Während die Zellbindung z.B. durch Zugabe von ca. 5,5 µg Protein/ml des HY-Präparates zu 40 % gehemmt wurde, benötigte man ca. 21 µg Protein/ml des K28-Präparates, um die gleiche Wirkung zu erzielen. In dem untersuchten Konzentrationsbereich von 2 - 34 µg/ml war mit dem Mutanten-Protein eine Hemmung von maximal 45 - 50 % erreichbar, während mit dem Wildtyp-Protein bei 34 µg/ml eine 100 %ige Hemmung

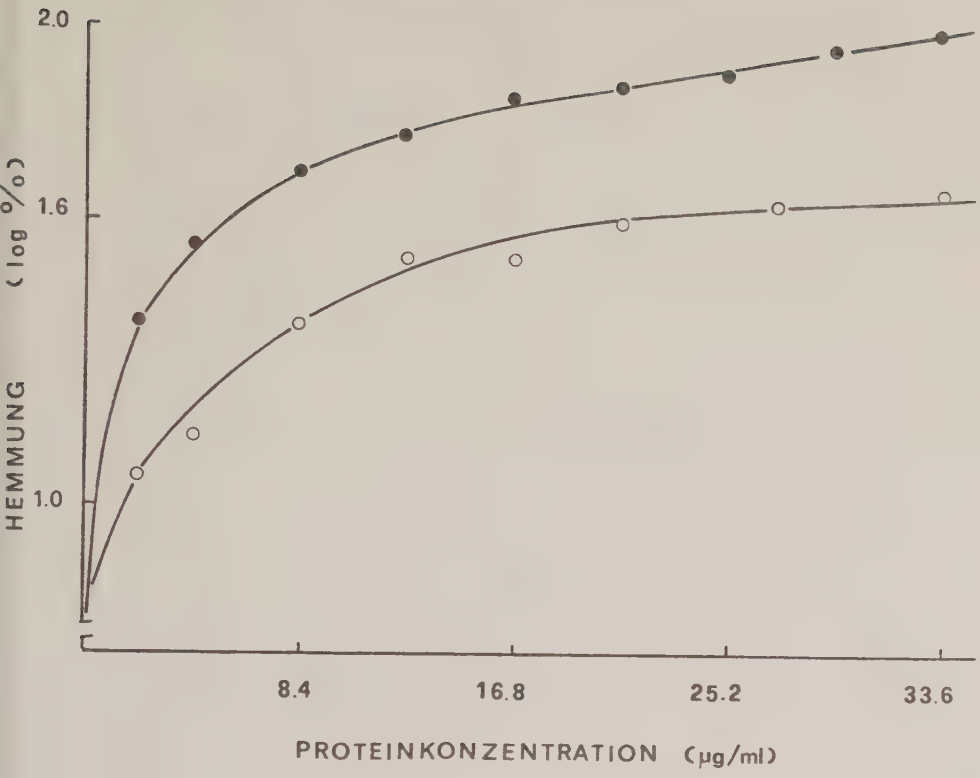

Abb. 25: Hemmwirkung gereinigter Fimbrien des Stammes HY (●—●) und der Mutante K28 (○—○) auf die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

erzielt wurde. Dieses Versuchsergebnis spricht für die Fimbrien als entscheidendes Organell von S. marcescens HY für die Zellbindung an Sephadex.

. Diskussion

.1. Physiologie der Zellbindung

pH-Wert und Ionenstärke. Milieufaktoren, wie z.B. pH-Wert und Ionenstärke, bedingen die Fähigkeit vieler Bakterien, sich an bestimmte Oberflächen anzuheften. Bei S. marcescens HY dagegen findet man keine ausgeprägte Milieuabhängigkeit der Zellbindung an Sephadex: Der Anteil gebundener Zellen blieb innerhalb eines pH-Bereiches von 4,6 - 8,2 nahezu unverändert (siehe Tab. 7). Auch die Ionenstärke des Mediums übte keinen bemerkbaren Effekt auf die Bindefähigkeit der Zellen aus (siehe Tab. 8). Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, daß elektrostatische Wechselwirkungen bei der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Temperatur. Temperaturunterschiede können oft drastische Effekte auf die Bindefähigkeit von Bakterien ausüben. Aus der Literatur ist bekannt, daß Zellbindung bei höheren Temperaturen (z.B. 30°C) häufig effizienter erfolgt, als bei niedrigen (z.B. 6°C) (31). Verschiedene Autoren argumentieren, daß die Ursachen dieser Unterschiede in der Konformation der Polymere auf der Zelloberfläche zu suchen sind (30,66). In diesem Zusammenhang sind oft schleimige zellgebundene Polysaccharide genannt worden (30). Durch Inkubation von S. marcescens HY mit Sephadexpartikeln wurde festgestellt, daß sich der Umfang und wahrscheinlich auch die Kinetik der Zellbindung in einem Bereich von 6 - 37°C nicht änderten. Bei allen untersuchten Temperaturen wurde nach ca. 5 min Inkubation ein maximaler Bindungswert erreicht (siehe Abb. 5). Dieses Bindeverhalten von S. marcescens HY stellt jedoch keinen Einzelfall dar. Es ist berichtet worden, daß Zellen bestimmter Stämme von Bifidobacterium thermophilum, Bifidobacterium pseudolongum sowie einer Bacteroides-Art sich bei 38°C ebenso gut an Stärkekörner anheften wie bei 4°C (66). Auch die Anzuchttemperatur übte in einem Bereich von 20 - 38°C keinen Einfluß auf die Zellbindeeigenschaften von S. marcescens HY aus (siehe Tab. 9).

Hydrolasen und Glykosyltransferasen. Es besteht häufig ein Zusammenhang zwischen der Produktion von bestimmten extrazellulären Hydrolasen durch Bakterien und ihrer Fähigkeit, sich an die entsprechenden (potentiellen) Nährsubstrate anzuheften. Minato und Suto fanden z.B., daß Rinderpansenbakterien, die an Stärkekörner binden können, eine erheblich höhere spezifische Amylase-Aktivität aufweisen als bindeunfähige Rinderpansenbakterien (66). Dieser Sachverhalt trifft für die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex nicht zu, da lösliches Dextran (MG ca. 70 x 10^3) von den Zellen nicht als einzige Energie- und C-Quelle genutzt wird (siehe 3.1.1.). Auch Dextran-Oligosaccharide, die aus zwei oder mehr Glc-Resten bestehen, werden von S. marcescens HY nicht metabolisiert (siehe 3.1.3.5.). Es wäre jedoch möglich, daß eine enzymatische Spaltung des Dextranmoleküls ohne nachfolgende Verwertung der Spaltprodukte stattfindet. Roseman (76) entwickelte ein Modell zur Erklärung der molekularen Mechanismen eukaryotischer Zell-Zell Interaktionen. Er postuliert, daß die Erkennung und Verbindung der Zellen mittels zellgebundener Glykosyltransferasen und ihren entsprechenden Glykosylrezeptoren auf der Oberfläche der Partnerzellen erfolgt (35). Auch die anfängliche Interaktion von Streptococcus mutans mit Zahnoberflächen beruht sehr wahrscheinlich auf einer Bindung zellgebundener Glykosyltransferasen an die an den Zahnschmelz adsorbierten Mundspeichel-Glykoproteine (82). Rosemans Modell ist jedoch zur Erklärung der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex ungeeignet, da alle bisherigen Ergebnisse darauf hindeuten, daß die Zellbindung an Sephadex, zumindest die primäre Reaktion, nicht auf einem enzymatischen Vorgang basiert. Für diese Schlußfolgerung spricht auch die Unabhängigkeit der Zellbindung von metabolischer Energie. Die Zellbindung erfolgte auch dann, wenn der Testansatz 25 mM Kaliumzyanid oder 0,2 % Natriumazid enthielt (siehe 3.1.3.1.).

Wuchsphase. Der physiologische Zustand der Zellen kann für die bakterielle Bindung an Oberflächen ebenfalls von Bedeutung sein. Oft zeigte sich, daß Kulturen mit zunehmendem Alter immer niedrigere Bindungsraten aufweisen (31).

Fletcher erklärt dieses Verhalten durch mögliche Veränderungen in der Zusammensetzung oder in der vorhandenen Menge von bestimmten Zelloberflächenpolymeren in den verschiedenen Wachstumsphasen (30). Eine solche Abhängigkeit der Bindung von der Wuchsphase der Zellen wurde bei S. marcescens HY nicht beobachtet: Die Bindungsraten von logarithmischen und stationären Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 6).

Beweglichkeit (Begeißelung). Auch die Beweglichkeit des Bakteriums kann die Bindungsrate beeinflussen: Wird z.B. die Kollisionschance zwischen Bakterium und Bindeträger durch aktive Zell-Fortbewegung erhöht, so vergrößert sich dadurch die Möglichkeit zur Zellbindung (31). Dieser Umstand spielt bei der Zellbindung von S. marcescens an Sephadex keine Rolle; unbegeißelte Bakterienstämme (z.B. HY) und begeißelte (z.B. W 1770) zeigten oft gleiches Bindeverhalten (siehe Tab. 22).

Anzuchtmedium. Zellen von S. marcescens HY die in Minimalmedien gewachsen waren, wiesen höhere Bindungsraten an Sephadex auf als solche, die in Komplettmedien gezüchtet wurden. Die Art der in den M9 Minimalmedien eingesetzten C-Quelle hatte keinen Einfluß auf die Bindeeigenschaften der Zellen (siehe Tab. 5). Ein Zusatz von 0,25 % Casaminoacids in den Minimalmedien verminderte die Bindefähigkeit der Zellen. Wahrscheinlich beruhten die verschiedenen Bindungsraten auf einer von dem Anzuchtmedium bedingten unterschiedlichen Affinität der Zellen zum Bindesubstrat (Sephadex). Die in diesen Versuchen verwendeten Kulturen wurden zentrifugiert und die gewonnenen Zellsedimente in P-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden sie ohne Waschvorgang im Bindetest eingesetzt. Spätere Inhibitionsexperimente ergaben, daß die Zellbindung durch verschiedene Proteine hemmbar ist (siehe 3.1.3.3.). Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß Reste des Nährmediums, z.B. Peptone oder Aminosäuren, für die verminderten Bindungsraten der in Komplettmedien gezüchteten Kulturen verantwortlich sind.

Hemmende Zucker. Das Phänomen der Agglutination von roten

Blutkörperchen durch Enterobakterien ist seit langem bekannt. Schon 1955 entdeckten Collier und Miranda, daß unter vielen getesteten Sacchariden nur Mannose fähig war, eine E. coli-Hämagglutination (Adhäsin) zu hemmen (in 73). Ähnliche Mannose-empfindliche Adhäsine wurden nachfolgend von Duguid bei der Mehrheit der von ihm untersuchten Shigella-, Klebsiella-, Salmonella- und Serratia-Stämme gefunden (20). Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen hat er sie als Fimbrien Typ 1 charakterisiert (20). Die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex wird durch Zugabe von Mannose (Endkonzentration 0,1 M) nicht gehemmt, d.h. die Interaktion ist Mannose-resistent (siehe Tab. 6). Es sind weitere Adhäsine isoliert worden, die eine andere Zuckerspezifität aufweisen. Auf der Zelloberfläche eines Pyocyanin-produzierenden Stammes von Pseudomonas aeruginosa befindet sich neben einem Mannose-spezifischen auch ein Galaktose-spezifisches Hämagglutinin (36,37). Die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex weist jedoch keine Empfindlichkeit gegenüber Galaktose (oder einem anderen von insgesamt 20 getesteten Mono-, Di-, Tri- und Methylsacchariden) auf (siehe Tab. 16). Zu Beginn der Experimente für diese Dissertation zeigte Maltose eine stimulierende Wirkung auf die Zellbindung an Sephadex. Bei Verwendung eines anderen Maltose-Präparates ließ sich dieses Ergebnis jedoch nicht mehr reproduzieren. Die Ursache dieser Diskrepanz wurde nicht näher untersucht; es wird vermutet, daß das erste Maltose-Präparat Oligosaccharide oder Stärkedextrine enthielt, die zu einer leichten, mit bloßen Augen nicht feststellbaren Bildung von Zellagglutinaten führten. Diese Zellagglutinate könnten beim Absetzen der schwereren Sephadexpartikel unspezifisch mitsedimentiert sein. Daß kommerzielle Maltose-Präparate häufig derartige Verunreinigungen enthalten, konnte Lehrfeld mit Hilfe der Papierchromatographie eindeutig nachweisen (57).

4.2. Kinetik der Zellbindung

Die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine wurde als Funktion der zum Bindetest eingesetzten Zellkonzentration untersucht (siehe 3.1.2.1.). Die Zellbindung wies ein typisches Sättigungsverhalten auf (siehe Abb. 2a, Kurve A). Betrachtet man den Vorgang der Zellbindung als eine chemische oder enzymatische Reaktion, kann man annehmen, daß bei niedrigen Zellkonzentrationen (N) ein Bereich von Kinetik 1. Ordnung bezüglich (N) vorherrscht, d.h., da die Sephadexkonzentration konstant bleibt, ist die Bindungsrate nur von der Zellkonzentration (N) abhängig. Durch Erhöhung der Zellkonzentration (N) nähert sich die Zellbindung einem Sättigungszustand, wo ein Bereich von Kinetik nullter Ordnung bezüglich (N) besteht, d.h. die Bindungsrate ist unabhängig von (N).

Die Langmuirsche Isotherme entspricht einer solchen Sättigungskinetik. Ursprünglich wurde sie zur Beschreibung der Adsorption von Gasen an Grenzflächen entwickelt (07). Sie wird heutzutage aber auch häufig verwendet, um die Kinetik der anfänglichen Bindung von Bakterien an Oberflächen formal zu beschreiben (01,30). Im folgenden soll diskutiert werden, inwieweit die Langmuirsche Isotherme auf die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex übertragbar ist. Mit ihrer Hilfe konnte zwar ein befriedigender Wert für die Bindekapazität des Trägers (q_{max} = 1,6 x 10^9 Zellen/45 mg Sephadex) errechnet werden, dennoch ist dieses Ergebnis mit Vorbehalten zu betrachten. Die Gleichgewichtskonstante für die Zellbindung betrug b = 1 x 10^{-9}. Wie schon vorher erwähnt wurde, setzt die Langmuirsche Isotherme voraus, daß die adsorbierten Liganden eine monomolekulare, in diesem Fall monozelluläre Schicht an der Oberfläche bilden. Nur direkte Wechselwirkungen zwischen den Zellen könnten zur Bildung einer multizellulären Schicht führen. Unter normalen Bedingungen, d.h. ohne einen Zusatz, neigen die in einer neutralen Lösung suspendierten Zellen von S. marcescens HY nicht zur Bildung von mikroskopisch erkennbaren

Zellaggregaten, sehr wahrscheinlich aufgrund ihrer negativen Nettoladung. Demnach ist anzunehmen, daß sie an der Sephadexoberfläche eine Monoschicht bilden. Neue elektronenmikroskopische Untersuchungen (Portales, Winkler, nicht veröffentlicht) scheinen diese Annahme zu bestätigen.

Das Reaktionsschema der Zellbindung an Sephadex kann prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen dargestellt werden:

1) Zelle + Sephadex $\underset{k_2\ (?)}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}}$ Zelle-Sephadex

2) Zelle + Sephadex $\xrightarrow{k_i}$ (Zelle-Sephadex)

Während Reaktion 2 irreversibel ist, d.h. die Bakterien und der Träger einen stabilen, undissoziierbaren Komplex bilden, handelt es sich bei Reaktion 1 um einen reversiblen Vorgang, wobei k_1 und k_2 die Konstanten für Vorwärts- und Rückwärtsreaktion sind.

Zo Bell (95) und nachfolgend Marshall et al. (61) beobachteten, daß der irreversiblen Bindung einiger Meeresbakterien an Oberflächen eine reversible Phase vorausgeht. Fletcher berichtete, daß bei der Bindung einer marinen Pseudomonas-Art an Polystyren-Platten keine Zell-Desorption folgte und es sich daher um eine irreversible Reaktion handelte. Für diese Untersuchung eliminierte sie den Desorptionsteil der Langmuirschen Isotherme (30).

Durch Zugabe verschiedener Substanzen, wie z.B. denaturiertes Pepsin und Tween 80, konnte festgestellt werden, daß die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex ein reversibler Vorgang ist (siehe 3.1.3.2. und 3.1.3.3.). Obwohl die durchgeführten Versuche keine gesicherten Aussagen über die mögliche spontane Desorption von Zellen während des Bindevorgangs gestatten, kann man sie aufgrund der Reversibilität der Zellbindung nicht vollkommen ausschließen. Über ihr Ausmaß können jedoch nur Vermutungen angestellt werden. Es ist aber unwahrscheinlich, daß ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der Adsorption und Desorption

von Zellen besteht, wie es die Langmuirsche Isotherme verlangt.

Die nach ihrer Größe definierten Sephadex G25 Fraktionen A (ϕ = 20,3 µm), B (ϕ = 108,3 µm) und C (ϕ = 258,7 µm) wurden als Bindeträger verwendet (die Zahlenangaben gelten für nicht gequollene Sephadexpartikel). Bei konstanter Zellkonzentration (N) und variabler Sephadexmenge wurde die Bindekapazität der jeweiligen Trägersubstanzen von der gesamtverfügbaren Oberfläche der Partikel bedingt, d.h. bei gleicher Konzentration ist die Bindungsrate um so höher, je kleiner die Partikel sind (siehe Abb. 4). Durch Berechnung der Bindekonstanten k ergab sich eine gute Proportionalität zwischen der Zellbindemöglichkeit und der verfügbaren Oberfläche der Partikel (siehe Tab. 4). Die Bestimmung des mittleren Durchmessers der für die Mehrheit der Experimente verwendeten Sephadex G25 fine-Partikel (im gequollenen Zustand) ermöglichte eine Berechnung von Mittelwerten für die Oberfläche und das Volumen eines Partikels. Durch Ermittlung des Gesamtvolumens der Partikel in einer bestimmten gequollenen Gel-Menge (1 g) wurde dann die Anzahl der Partikel pro Gewichtseinheit bestimmt (siehe 3.1.2.1.). Unter standardisierten Bedingungen hefteten sich ca. 2690 Bakterien an ein Partikel. Statistisch gesehen, entspräche dieser Wert einer Zelle pro 9,3 μm^2. Nach der Langmuirschen Isotherme können an 45 mg Sephadex maximal 1,6 x 10^9 Zellen binden. Dies bedeutet 4300 Zellen pro Partikel oder 1 Zelle pro 5,8 μm^2. Wenn man sich eine Fläche von 5,8 μm^2 als Kreis vorstellt, hätte dieser einen Durchmesser von 2,72 µm. Die Kreisfläche würde einem Bakterium von ca. 0,5 um Durchmesser und ca. 2,0 µm Länge eine Rotation am Bindeort ermöglichen, ohne mit benachbarten gebundenen Bakterien zu kollidieren.

Eine weitere Voraussetzung zur Anwendung der Langmuirschen Isotherme ist die homogene Oberflächenstruktur des Bindesubstrates. Aufgrund der chemischen Beschaffenheit der Sephadexpartikel, der Abhängigkeit der Bindungsraten von der Größe der Partikel und dem Sättigungsverlauf der Zell-

bindung wird diese Voraussetzung wahrscheinlich erfüllt.

Durch Anwendung der Michaelis-Menten Gleichung in einer linearisierten Form wurde auf graphischem Weg (Lineweaver-Burk Diagramm, Abb. 2c) die Bindekapazität des Trägers (q_{max}) und die Bakterienkonzentration berechnet, bei der 50 % der hypothetischen Bindestellen besetzt sind (Km):

$q_{max} = 2{,}1 \times 10^9$ gebundene Zellen/45 mg Sephadex

$Km = 2{,}85 \times 10^9$ Zellen/ml

Diese Werte müssen aber ebenfalls mit Einschränkungen betrachtet werden, insbesondere weil a) die experimentell ermittelten q-Werte, wie schon vorher erwähnt wurde, nicht einer Anfangsreaktionsrate (z.B. µmole/liter.min) entsprechen, sondern einem unter den gegebenen Versuchsbedingungen erreichten Zustand (gebundene Zellen/mg Sephadex) und b) in einer enzymatischen Reaktion das Enzym bei der Produktbildung wieder freigesetzt wird und daher neue Substratmoleküle umsetzen kann, während bei der Zellbindung die besetzten Sephadexbindestellen nicht mehr in der Lage sind, neue Bakterien zu binden.

4.3. Hemmung der Zellbindung

In den Versuchen zur Hemmbarkeit der Zellbindung wurde die Hemmwirkung der eingesetzten Substanzen nach jeweils 30 min bestimmt (siehe Hemmtest). Durch dieses Verfahren konnte ein Hemmeffekt, der nur die Anfangskinetik, d.h. die Geschwindigkeit der Zellbindung beeinflußt, nicht erfaßt werden.

Polysaccharide. Glykogen und Amylopektin bewirkten bei einer Konzentration von 4,17 bzw. 1,25 mg/ml eine 50 %ige Hemmung der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex, während 21 verschiedene Mono-, Di-, Tri- und Methylsaccharide unwirksam waren (siehe 3.1.3.4.). Unter den getesteten Substanzen befanden sich Glucose, Maltose und Maltotriose, sodaß die Hemmwirkung von Glykogen und Amylopektin sehr

wahrscheinlich auf ihre makromolekularen Eigenschaften zurückzuführen ist. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten dieser Polysaccharide mit dem Dextran könnte man vermuten, daß sie eine kompetitive Hemmung der Zellbindung bewirken. Für diese Annahme spricht die Tatsache, daß S. marcescens HY-Zellen sehr effizient an Stärkekörner binden (siehe Abb. 13). Es wurde jedoch bisher experimentell nicht ausgeschlossen, daß die Hemmwirkung nicht kompetitiv ist.

Isomaltooligosaccharide. Durch eine saure Hydrolyse von Dextran und nachfolgende Gelchromatographie wurden Isomaltooligosaccharide isoliert. Ihr Einsatz im Hemmtest brachte jedoch nicht den erhofften Erfolg. Bei einer Konzentration von 0,05 M verursachten alle getesteten Isomaltooligosaccharide ab Isomaltopentaose Zellklumpung. Da schon Isomaltooligosaccharide, die aus nur 5 Glc-Resten bestehen, Zellklumpung bewirken, ist in diesem Fall das Polymer-Überbrückungsmodell (engl. polymer bridging) zur Erklärung dieses Effektes nicht geeignet (88). Untersuchungen von Rorem zeigten, daß das Dextran von Leuconostoc mesenteroides sowohl Kationen (Rubidium-Ionen) als auch Anionen (Phosphat-Ionen) binden kann (75). Dextran läßt sich auch durch den kationischen Farbstoff Ruthenium rot färben (08). Auch Dextran von anderen Bakterienspezies zeigt dieses anomale Verhalten (53,65). Versucht man die beobachtete Zellklumpung von S. marcescens HY mit Hilfe dieser Erkenntnisse zu erklären, so kann man annehmen, daß die Isomaltooligosaccharide mit anionischen Gruppen der Polymere auf der Zelloberfläche entweder direkt oder mittels divalenter Kationen (z.B. Ca^{++}) interagieren. Diese Wechselwirkung könnte eine Neutralisierung des Ladungseffektes bewirken. Andererseits wäre es auch möglich, daß die Isomaltooligosaccharide mit Dextran-ähnlichen Oberflächenstrukturen, z.B. Kapseln oder den O-antigenen Komponenten der Lipopolysaccharide, interagieren und so zu einer Maskierung geladener Gruppen führen (siehe Abb. 26).

Proteine. Von den im Bindetest eingesetzten Proteinen stellten sich Concanavalin A, Alkohol Dehydrogenase, Pepsin, Rin-

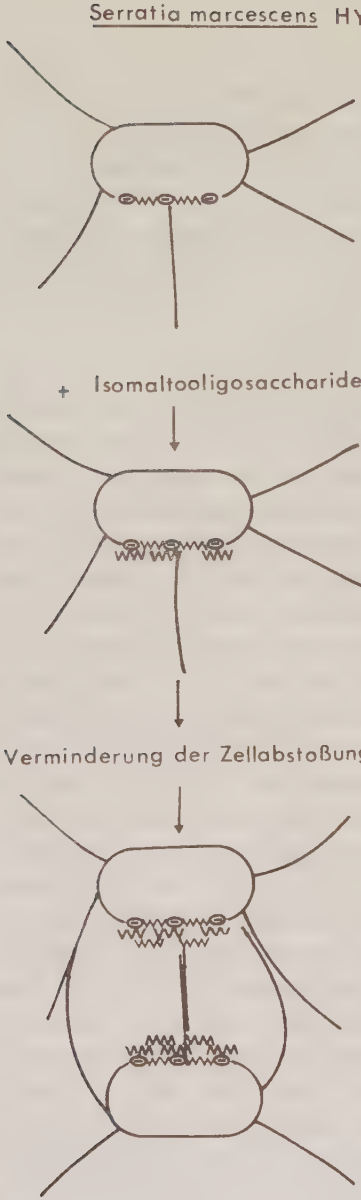

Abb. 26: Schematische Darstellung der Hypothese zur Zellklumpung von S. marcescens HY durch Isomaltooligosaccharide.

derserumalbumin, Fibrinogen und Fetuin bei einer Konzentration von 1,5 µM als sehr effektive Inhibitoren der Zellbindung heraus (siehe Tab. 12). Die Hemmwirkung durch Proteine könnte auf einer sterischen Hinderung der Zellbindung beruhen. Diese Annahme stützt sich auf Ergebnisse verschiedener Autoren (13,39,56), die zeigen, daß Fibrinogen, Rinderserumalbumin und Concanavalin A mit löslichem Dextran interagieren. Darüberhinaus ist bekannt, daß Concanavalin A und Rinderserumalbumin ebenfalls mit Sephadex interagieren (38, 69). Da diese Proteine aufgrund ihrer isoelektrischen Punkte (pI) bei dem für die Hemmversuche verwendeten neutralen pH-Wert eine negative Nettoladung aufweisen, könnten die Sephadexpartikel durch die Adsorption des Proteins negativ geladen werden. Dieser Zustand könnte zu einer elektrostatischen Abstoßung der Bakterien führen. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß einige der hemmwirksamen Proteine nicht mit dem Dextran, sondern mit den Zellen oder mit Dextran und Zellen gleichzeitig interagieren. Ein schlüssiger Beweis für eine der hier aufgestellten Hypothesen konnte jedoch nicht erbracht werden. Bindeversuche mit radioaktiv markierten Proteinen könnten wahrscheinlich zu einer Klärung der noch offenen Fragen beitragen.

In Tab. 26 sind die durchschnittlichen Hydrophobizitäten einiger der in den Hemmexperimenten verwendeten Proteine und ihre Hemmwirkung der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex zusammengefaßt. Die Hemmwirkung scheint unabhängig von der durchschnittlichen Hydrophobizitat der Proteine zu erfolgen. Diese Annahme muß jedoch aus mehreren Gründen mit Vorbehalten versehen werden:

a) Einige Proteine, wie z.B. Serumalbumin und Concanavalin A (in Tab. 26 nicht aufgeführt), besitzen in ihrem Molekül hydrophobe Zonen (O5,48). Aus diesem Grund könnte man sich vorstellen, daß sie eine größere Affinität zu Strukturen oder Gruppen mit hydrophober Natur zeigen, als Proteine, die eine höhere durchschnittliche, aber nicht an bestimmten Stellen konzentrierte Hydrophobizität besitzen.

Proteine	$H\Phi_{ave}$ [a] (cal/res)	Hemmung der Zellbindung (%)
Ovomucoid	920	0,0
Fibrinogen	1020	65,1
Avidin	1060	1,9
Pepsin	1080	76,6
γ-Globulin	1090	30,7
Myoglobin	1090	18,6
Cytochrom C	1110	19,9
Ovoalbumin	1110	0,0
Rinderserumalbumin	1120	75,3

Tab. 26: Durchschnittliche Hydrophobizität einiger Proteine und ihre Hemmwirkung auf die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex G25 fine.

[a] Durchschnittliche Hydrophobizität = $H\Phi_{ave}$ = $\frac{\text{Gesamthydrophobizität des Moleküls (cal)}}{\text{Gesamtanzahl von Aminosäureresten}}$

Werte entnommen aus Bigelow (03).

Die Berechnung der Gesamthydrophobizität eines Proteins basiert auf den von Tanford ermittelten Werten der freien Energien des Transfers der freien Aminosäuren, aus denen sich ein Protein zusammensetzt, von einem organischen in ein wäßriges Medium (zitiert in 03).

b) Bei denaturierten Proteinen, wie in diesen Experimenten Pepsin, können hydrophobe Regionen oder Gruppen exponiert werden, die normalerweise ins Innere des Moleküls gerichtet sind.

Detergenzien. Tween 80 sowie andere Tween-Typen (Konzentration = 0,25 % w/v) hemmten die Zellbindung an Sephadex vollständig (siehe Tab. 11). Bereits gebundene Zellen von S. marcescens HY wurden durch Tween 80 von den Sephadexpartikeln freigesetzt (siehe 3.1.3.2.). Die Eluierbarkeit der Zellen durch Tween zeigt, daß die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex ein reversibler Vorgang ist und legt die Vermutung nahe, daß an der Zellbindung hydrophobe Gruppen oder Strukturen beteiligt sind.

4.4. Bakterielle Struktur für die Zellbindung

Prodigiosin. Einige Stämme der Gattung Serratia bilden den roten Farbstoff Prodigiosin, der sich makromolekular gebunden in der Zelloberfläche befindet und ein Tripyrrol-Derivat ist. Die hydrophoben Eigenschaften der Zellen werden zumindest teilweise diesem Pigment zugeschrieben (49). Prodigiosin spielt jedoch sehr wahrscheinlich bei der Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex keine wesentliche Rolle, da Stämme, die kein Prodigiosin bilden (z.B. W 1766, W 1767) ebenso gut an Sephadex binden, wie Prodigiosin-produzierende Stämme (z.B. HY) (siehe Tab. 22).

Fimbrien. Fimbrien besitzen oft adhäsive Eigenschaften (73). Ein gemeinsames Merkmal der bisher untersuchten Fimbrien ist ihr hoher Anteil an nichtpolaren, d.h. hydrophoben Aminosauren (73). Die Elektronenmikroskopie ermöglichte den Nachweis von Fimbrien auf der Zelloberfläche von S. marcescens HY. Über 90 % der Zellen besitzen zahlreiche, peritrisch angeordnete Fimbrien, deren Länge zwischen 0,28 µm und 1,4 µm variiert. Der entsprechende Fimbriendurchmesser liegt unter 7 nm. Zumindest eine andere Struktur wurde erkannt, die keine typische Fimbrienform aufweist (siehe Abb. 20). Ähnliche

Strukturen werden von einigen Autoren Fimbrillae genannt (20), da unbekannt ist, ob sie einen speziellen Fimbrien-Typ darstellen oder eine völlig andere Oberflächenstruktur sind. In dieser Arbeit wurden alle beide Zellanhänge von S. marcescens HY einheitlich als Fimbrien bezeichnet.

Für eine Beteiligung der Fimbrien an der Zellbindung spricht:

a) Die mechanische Ablösung der Fimbrien von den Zellen ist gleichbedeutend mit dem Verlust der Bindeeigenschaften der Zellen (siehe 3.3.1.).

b) Eine Vorbehandlung von S. marcescens HY-Zellen mit Protein-degradierenden (Proteinase K) oder Protein-denaturierenden (Harnstoff) Agenzien machte eine Zellbindung an Sephadex unmöglich. Alle bisher untersuchten Fimbrien (z.B. von E. coli oder Pseudomonas aeruginosa K) bestehen aus Protein-Untereinheiten (73). Zellen von S. marcescens HY, die 5 min bei 100°C vorinkubiert wurden, waren ebenfalls bindeunfähig (Hitzedenaturierbarkeit vieler Proteine).

Gegen die Annahme, daß die Fimbrien bei der Zellbindung als adhäsive Organelle fungieren, spricht die Existenz zweier Mutanten (K9 und K28), die eine stark verminderte Bindefähigkeit an Sephadex aufweisen und dennoch über Fimbrien verfügen (siehe 3.2.).

Zur Isolierung von Fimbrien der Stämme HY und K28 wurden gewaschene M9 Glc-Kulturen in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,0, mit einem Waring blendor behandelt. Nach Abzentrifugation der Zellen wurden durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einem 50 %igen Sättigungsgrad die in den Überständen enthaltenen Fimbrien ausgefällt. Die ausgefällten Fimbrien sammelten sich auf der Oberfläche der Flüssigkeit. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß die Fimbrien des Stammes HY, ähnlich wie die Fimbrien anderer Bakterienspezies, von stark hydrophober Natur sind.

Der zweite Reinigungsschritt nach der Ammoniumsulfat-Fällung, die Gelchromatographie mit Bio Gel A50m, ermöglich-

te die Trennung der Fimbrien von einem Material, das KDO enthielt (siehe Abb. 23). Durch Gelelektrophorese wurde versucht, den Reinheitsgrad der Fimbrienpräparate zu ermitteln. Hierbei stellte sich die Solubilisierung der Fimbrien als besonders schwierig heraus. Nach der Färbung des Acrylamid-Gels mit Coomassie Blue wurde nur eine Bande schwach sichtbar. Aus diesem Grund können keine gesicherten Aussagen über den Reinheitsgrad gemacht werden. In den Fimbrienpräparaten wurde neben Protein auch Polysaccharid nachgewiesen (siehe Tab. 25). Herauszufinden, ob das Polysaccharid ein Bestandteil der Fimbrien ist oder eine Verunreinigung darstellt, bleibt weitergehenden Untersuchungen vorbehalten.

Die Zellbindung von S. marcescens HY an Sephadex wurde in Anwesenheit der gereinigten Fimbrienpräparate des Stammes HY bzw. der Mutante K28 untersucht. Die Fimbrien der Mutante zeigten dabei eine geringere Hemmwirkung als die des Wildtyps. Während die Wildtyp-Fimbrien die Zellbindung bei einer Proteinkonzentration von 34 µg/ml vollständig unterbanden, bewirkten die Mutanten-Fimbrien bei der gleichen Konzentration nur eine 45 - 50 %ige Hemmung (siehe Abb. 25). Diese unterschiedlichen Hemmwirkungen legen die Vermutung nahe, daß die Mutanten-Fimbrien eine veränderte Aminosäurezusammensetzung haben, die für die verminderte Affinität der Mutanten-Zellen an Sephadex verantwortlich ist.

Die Zellen des Stammes W 1128 besitzen ebenfalls Fimbrien (Portales, Winkler, nicht veröffentlicht). Sie sind jedoch nicht befähigt, an Sephadex zu binden (siehe Tab. 22). Es ist wahrscheinlich ein bestimmter Fimbrien-Typ nötig, um mit partikulären Polyglucanen interagieren zu können.

Bei einer Untersuchung mehrerer Serratia-Stämme stellte Duguid fest, daß einige von ihnen sowohl Fimbrien des Typs 1 als auch Fimbrien des Typs 3 synthetisieren (20). Die Fimbrien der Typen 1 und 3 unterscheiden sich voneinander hauptsächlich in ihrem Durchmesser und ihren adhäsiven Eigenschaften. Die durch Fimbrien des Typs 1 bedingte Adhäsion von Bakterien an tierische und pflanzliche Zellen wird durch

eine starke Mannose-Empfindlichkeit charakterisiert, während die Interaktion der Fimbrien des Typs 3 mit Oberflächen Mannose unempfindlich ist (20). Die Zellbindung von S. marcescens HY ist ebenfalls Mannose-resistent. Aufgrund elektronenmikroskopischer Untersuchungen berichtet Duguid, daß sich S. marcescens HY-Zellen mit Hilfe von Fimbrien des Typs 3 an Glas, pflanzliche Zellen und Cellulose-Fasern anheften (20). Weitere Untersuchungen über diese Interaktion wurden jedoch nicht veröffentlicht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen bis zu einem gewissen Grad die Befunde Duguids. Serratia marcescens HY interagiert mit partikulären Polyglucanen und wahrscheinlich auch mit Glas. Die "normalen" Fimbrien auf der Oberfläche der Wildtyp-Zellen (siehe Abb. 19) könnten die von Duguid beschriebenen Fimbrien des Typs 3 sein. Da auf einigen Zellen andere Oberflächenstrukturen deutlich zu erkennen waren (siehe Abb. 20), und nicht auszuschließen ist, daß die Mehrheit der Zellen über diese Fimbrien verfügt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht entschieden werden, welche von diesen Strukturen die Zellbindung an partikuläre Polyglucane bewirkt. Sollte sich bei zukünftigen Experimenten herausstellen, daß die Zellbindung von S. marcescens HY an Glas und partikuläre Polyglucane mittels Fimbrien des Typs 3 zustandekommt, wären noch die Mechanismen dieser Interaktion zu untersuchen. Es ist nämlich bekannt, daß die Fimbrien des Typs 1 von E. coli bei einer unspezifischen Interaktion mit ihren Spitzen an verschiedene hydrophobe Strukturen binden, während sie sich bei der spezifischen Bindung scheinbar der Länge nach an Mannose-enthaltende Strukturen anheften (73).

4.5. Substrat-Spezifität [a] der Zellbindung

Zellen von Serratia marcescens HY binden vorzugsweise an solche partikulären Substanzen, die sich aus Polyglucanen zusammensetzen. Während Sephadex, Kartoffelstärke und Cellu-

[a] Substrat wird hier nicht im Sinne eines Nährsubstrates sondern als Bezeichnung eines Bindesubstrates gebraucht.

lose sich gut als Zellbindesubstrate eigneten, fand an Bio Gel P2, ein Polymer aus Styrol und Divinylbenzol und Kiesel Gel GC keine Zellbindung statt. Eine geringe Zellbindung erfolgte an Cytodex und Servacel, Substanzen die aus vernetztem Dextran bzw. Cellulose bestehen und mit DEAE- bzw. Carboxymethylgruppen substituiert sind (siehe Tab. 20).

Durch Verwendung chemisch modifizierter Sephadex G25-Partikel (hydroxypropylierte bzw. azetylierte) und Kartoffelstärkekörner (Stärkeaminether, Distärkephosphat, azetyliertes Distärkephosphat) wurde eindeutig nachgewiesen, daß die Einführung von chemischen Gruppen in die partikulären Polyglucane die Bindekapazität des Trägers stark verminderte. Diese Substanzen, besonders die Stärkederivate[a], besitzen einen niedrigen Substitutionsgrad, d.h. die Mehrheit der Glucose-Einheiten bleibt nach der Reaktion unverändert.

Zur Erklärung der verminderten Bindekapazität der modifizierten Trägersubstanzen bieten sich folgende Hypothesen an:

a) Die Einführung anionischer bzw. kationischer Gruppen reduziert die hydrophoben Eigenschaften derjenigen Strukturen auf den partikulären Trägern, die von den Fimbrien als Bindestellen erkannt werden.
b) Die anionischen Gruppen in den Trägern verändern die Nettoladung der Partikel, sodaß eine elektrostatische Abstoßung zwischen negativ geladenen Zellen und Partikeln stattfindet.
c) Die chemischen Gruppen (anionische, kationische bzw. neutrale) in den Trägern bewirken eine sterische Hinderung des Kontaktes zwischen den bakteriellen Bindestrukturen und den Bindestellen auf der Oberfläche des Substrates.

---

[a] Die verwendeten Stärkederivate werden zu Lebensmittelzwecken hergestellt. Diese Produkte haben im allgemeinen einen äußerst geringen Substitutionsgrad, der zwischen 0,25 und 0,001 Mole je Mol Stärke liegt (42).

Aufgrund des hohen Anteils an Hydroxylgruppen in den Polyglucan-enthaltenden Strukturen wäre denkbar, daß die Anheftung von S. marcescens HY mittels Wasserstoffbindungen zwischen Gruppen der bakteriellen Bindestrukturen und den Hydroxylgruppen auf der Oberfläche der partikulären Polyglucane erfolgt. Da die verwendeten Polyglucanderivate in ausreichendem Maße Hydroxylgruppen besitzen, ihre Bindekapazität aber dennoch stark vermindert ist, kann eine Interaktion allein mit den Hydroxylgruppen die Zellbindung an Sephadex nicht erklären. Sephadex enthält eine geringe Anzahl an Carboxylgruppen, die eventuell elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Substanzen eingehen können (Angaben des Herstellers Pharmacia). Wie schon vorher erwähnt wurde, neigt lösliches Dextran außerdem zu einer Interaktion mit Kationen und Anionen (75). Die Zellbindung an Sephadex kann aber nicht primär auf einer elektrostatischen Interaktion beruhen, da sie auch bei hohen Ionenstärke- und pH-Werten des Mediums erfolgt (siehe Tab. 7 und 8).

Sephadex ist ein synthetisches Gel. Die Eigenschaften eines Gels werden im allgemeinen durch den Charakter und die Anzahl der Interaktionen zwischen den Polysaccharidmolekülen bestimmt. Diese Faktoren werden wiederum von der Zuckerzusammensetzung und dem Bindungstyp der Polysaccharidketten bedingt (74). Da die Zellbindung an Sephadex durch mehrere niedermolekulare Saccharide nicht hemmbar ist (siehe Tab. 16), kann man annehmen, daß die zellulären Bindestrukturen nicht einen bestimmten Zucker erkennen, wie es bei einigen Lektinen der Fall ist (38). Es wäre denkbar, daß durch die Interaktion von mehreren Dextranketten eine bestimmte Tertiärstruktur an der Oberfläche der Sephadexpartikel entsteht, die von den bakteriellen Liganden als spezifischer Binderezeptor erkannt wird.

4.6. Bindungstyp

Die Eluierbarkeit der gebundenen Zellen von den Sephadexpartikeln durch Tween 80 zeigt, daß die Zellbindung ein reversibler Vorgang ist und nicht auf einer kovalenten Bindung beruht. Die Versuche mit Tween 80 legen auch die Vermutung nahe, daß die Zellbindung an Sephadex im wesentlichen auf hydrophoben Wechselwirkungen basiert. In Einklang mit dieser Hypothese stehen folgende Fakten:

a) Eine Vorbehandlung der Zellen mit 10 mM EDTA beeinträchtigte die Bindefähigkeit der Bakterien nicht (siehe 3.1.3.6.). Die Zellbindung erfolgte in Anwesenheit von 10 mM EDTA genauso effizient, wie in den Kontrollen ohne Chelatbildner (Portales, Winkler, nicht veröffentlicht).

b) In Versuchen, in denen anstelle von Tween 80 ein NaCl-Gradient (0,1 - 1,0 M) zur Elution Sephadex-gebundener Zellen verwendet wurde, fand keine Freisetzung der Zellen statt (siehe 3.1.3.2.).

c) Die Zellbindung zeigte eine relativ niedrige Empfindlichkeit gegenüber hohen Ionenstärke- und pH-Werten des Mediums (siehe 3.1.2.4.).

d) Die Zellen von S. marcescens HY besitzen Fimbrien, die lateral miteinander interagieren (siehe Abb. 19). Die Fimbrien des Typs 1 von E. coli neigen ebenfalls dazu, miteinander zu interagieren. Brinton schreibt diese Wechselwirkung dem hydrophoben Charakter der Fimbrien zu (zitiert in 73). Ein weiterer Anhaltspunkt für die hydrophobe Natur der Fimbrien von S. marcescens HY ergibt sich aus ihrem Verhalten in wäßrigen Lösungen: Gefällte Fimbrien sammelten sich in der Luft-Wasser Interphase (siehe 3.3.1.).

Besonders schwer fällt in diesem Zusammenhang die Erklärung, wie die partikulären Polyglucane, die stark hydrophile Substanzen sind, eine hydrophobe Interaktion eingehen können. Die Möglichkeit, daß Polysaccharide mit hydrophoben Strukturen interagieren, ist auch von anderen Autoren erwähnt worden. Konieczyn-Janda und Stute zeigten, daß mit Hil-

fe der Differential-Raster-Kalorimetrie Stärke-Lipid- und Amylose-Lipid-Komplexe nachweisbar sind (55). Cyclodextrine sind zyklisch α 1,4 gebundene Oligosaccharide, die aus 6 - 12 Glc-Resten bestehen. Sie können in ihrem Molekül andere Verbindungen einschließen. Neuere experimentelle Ergebnisse und theoretische Überlegungen ergaben, daß van der Walls-Kräfte und hydrophobe Interaktionen sehr wanrscheinlich zur Bildung der Komplexe beitragen (79). Edwards und Rutter berichteten, daß lösliches Dextran eine hohe Affinität zu hydrophoben Silberjodidpartikeln aufweist (22).

S. marcescens HY ist ein opportunistischer Keim. Deshalb wäre vor allem für die Medizin eine Untersuchung der an der Zellbindung an Sephadex beteiligten Strukturen ninsichtlich ihrer Funktion bei der Zellbindung an Organe infizierter Menschen und/oder Tiere von größtem Interesse. Sollte sich herausstellen, daß eine Konkordanz zwischen der Anheftung an Polyglucane und der Bindung an Säugerzellen besteht, könnten mit dem in dieser Arbeit entwickelten Testsystem auf relativ einfache Art und Weise Bindeinhibitoren erprobt werden, die für den Einsatz in Therapien vorgesehen sind.

5. Zusammenfassung

Die Zellbindung an feste Unterlagen ist ein bei Bakterien häufig gefundenes Phänomen. In dieser Arbeit wurde die Zellbindung von Serratia marcescens, Stamm HY, an partikuläre Polyglucane, insbesondere an Sephadex, charakterisiert.

Physiologie der Zellbindung

1) S. marcescens HY bindet an Sephadexpartikel, obwohl die Zellen nicht befähigt sind, lösliches Dextran (den Hauptbestandteil von Sephadex) als einzige Energie- und C-Quelle zu nutzen.
2) Die Zellbindung an Sephadex erfolgte unabhängig von metabolischer Energie, da sie weder durch 25 mM Kaliumzyanid noch durch 0,2 % Natriumazid hemmbar war.
3) Milieufaktoren wie die Temperatur, der pH-Wert und die Ionenstärke übten keinen Einfluß auf die Bindefähigkeit der Zellen aus.
   a) Innerhalb eines Bereiches von 6 - 37°C erfolgte die Zellbindung an Sephadex temperaturunabhängig. Zellen, die bei 20, 30 bzw. 38°C gewachsen waren konnten gleich gut an Sephadex binden.
   b) Der Umfang der Zellbindung zeigte in den gewählten Ionenstärke- (0,05 - 3,0 M) und pH-Bereichen (4,6 - 8,2) keine signifikanten Unterschiede.

   Diese Ergebnisse, ebenso wie die in den vorangegangenen Absätzen, deuten darauf hin, daß die Zellbindung an Sephadex nicht auf einem enzymatischen Vorgang beruht.
4) Die Zellbindung zeigte keine ausgeprägte Abhängigkeit von der Wuchsphase der Kulturen: Unter den gewählten Versuchsbedingungen hefteten sich ca. 40 % der logarithmischen bzw. der stationären Zellen an Sephadex.
5) Zellen, die in M9 Minimalmedium gezüchtet worden waren, konnten bedeutend besser (ca. 45 %) als die in Komplettmedien gewachsenen Zellen (ca. 25 %) an Sephadex binden. Die Art der in den M9 Minimalmedien eingesetzten C-Quelle (Glucose, Glycerin, Maltose bzw. Saccharose) hatte

keine bemerkbare Auswirkung auf die Bindefähigkeit der Zellen.

Kinetik der Zellbindung

1) Sephadex G25 superfine (A), medium (B) und coarse (C) wurden durch ein Siebverfahren fraktioniert und die mittleren Durchmesser der drei gesiebten Hauptfraktionen in trockenem Zustand mikroskopisch bestimmt (ϕ_A = 20,3 µm, ϕ_B = 108,3 µm, ϕ_C = 258,7 µm). Bindeversuche mit den größenfraktionierten Sephadex-Typen ergaben, daß bei konstanter Zellkonzentration und Versuchsdauer sowie variabler Sephadexkonzentration der Anteil freier Zellen exponentiell mit der Gesamtoberfläche der jeweils verwendeten Sephadexpartikel abnahm.
2) Die Untersuchungen des Bindeverhaltens von Zellsuspensionen mit zunehmendem Zelltiter (N = variabel) an eine festgelegte Sephadexkonzentration (c = konstant) zeigten, daß die Zellbindung einen typischen Sättigungsverlauf aufweist.

   Eine Auswertung der experimentellen Ergebnisse mit Hilfe der Langmuirschen Isotherme ergab folgende Werte: Bindekapazität des Trägers (q_{max}) = 1,6 x 10^9 gebundene Zellen/45 mg Sephadex. Gleichgewichtskonstante für die Zellbindung (b) = 1 x 10^{-9}.

   Bei Anwendung der Michaelis-Menten-Enzymkinetik ergab sich für q_{max} = 2,1 x 10^9 gebundene Zellen/45 mg Sephadex und für Km = 2,85 x 10^9 Zellen/ml. Km = Zellkonzentration, bei der 50 % der hypothetischen Bindestellen auf der Sephadexoberfläche besetzt sind.

   Nach der mikroskopischen Bestimmung des mittleren Durchmessers von 300 gequollenen Sephadex G25 fine-Partikeln wurden folgende Werte für das Volumen (V) und die Oberfläche (S) eines Partikels berechnet:
   V_p = 3,7 x 10^{-7} cm^3; S_p = 2,4 x 10^{-4} cm^2.

   Für 1 g Sephadex G25 fine wurde dann das Gesamtvolumen der Partikel in gequollenem Zustand ermittelt und anhand des mittleren Volumens eines Partikels die Gesamtanzahl an Partikeln geschätzt:

$8{,}27 \times 10^6$ Partikel/g Sephadex.
Nach der Langmuirschen Isotherme entspricht dieser Wert $4{,}3 \times 10^3$ gebundenen Zellen pro Partikel oder einer gebundenen Zelle pro 5,8 μm^2 Partikeloberfläche.

Hemmung der Zellbindung

1) 21 Mono-, Di-, Tri- und Methylsaccharide waren in der relativ hohen Konzentration von 0,1 M unfähig, die Zellbindung an Sephadex zu unterbinden.
2) Glykogen und Amylopektin bewirkten bei einer Konzentration 4,17 bzw. 1,25 mg/ml eine 50 %ige Hemmung der Zellbindung. Dieses Ergebnis sowie die Unfähigkeit von Glucose, Maltose und Maltotriose, die Zellbindung zu hemmen, lassen vermuten, daß die Hemmwirkung von Glykogen und Amylopektin auf ihren makromolekularen Eigenschaften beruht.
3) Verschiedene Stärkederivate (Hydroxypropylstärke, Carboxymethylstärke, Stärkeaminether) sowie lösliche Stärke erwiesen sich in einer Konzentration von 0,6 % (w/v) ebenfalls als gute Inhibitoren der Zellbindung.
4) Mehrere Dextranfraktionen verschiedener Molekulargewichte waren dagegen bei einer Konzentration von 0,25 % (w/v) unwirksam. Bei höheren Konzentrationen verursachten einige von ihnen Zellagglutination.
5) Isomaltooligosaccharide, die aus 2 bis 11 Glucoseresten bestehen, wurden isoliert und im Hemmtest eingesetzt. Bei niedrigen Konzentrationen ($0{,}625 \times 10^{-2}$ M) übte keines von ihnen eine Hemmwirkung aus. Alle Isomaltooligosaccharide ab Isomaltopentaose verursachten bei höheren Konzentrationen ($1{,}25 \times 10^{-2}$ M) Zellklumpungen, die wahrscheinlich auf einer Neutralisierung bzw. Maskierung der negativen Ladung der Zellen beruhen.
6) Verschiedene Proteine (Denaturiertes Pepsin, Concanavalin A, Alkohol-Dehydrogenase, Fetuin, Rinderserumalbumin, Fibrinogen) hemmten bei einer Konzentration von 1,5 µM die Zellbindung zu mehr als 50 %. Pepsin erreichte seine maximale Hemmwirkung schon bei einer Konzentration von etwa 0,1 µM (ca. 3,4 µg/ml). Alle hemmfähigen Proteine

besitzen einen isoelektrischen Punkt im sauren pH-Bereich.

7) Das nichtionische Detergenz Tween 80 ist befähigt, die Zellbindung an Sephadex nicht nur zu hemmen, sondern auch zu revertieren. Die verwendete Tween-Konzentration (0,1 - 0,25 % w/v) verursachte keine irreversible Schädigung der Bakterien. Nach 2 h Inkubation der Kulturen mit dem Detergenz wurde keine wesentliche Abnahme ihrer Keimtiter festgestellt. Die Hemmwirkung von Tween erfolgte unabhängig von der Art des Fettsäurerestes. Diese Ergebnisse deuten auf eine wesentliche Beteilung hydrophober Gruppen oder Strukturen an der Zellbindung an Sephadex hin.

Bakterielle Struktur für die Zellbindung

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung von S. marcescens HY ergab, daß über 90 % der Zellen zahlreiche peritrisch angeordnete Fimbrien besitzen. Die Länge der Fimbrien variierte zwischen 0,28 µm und 1,4 µm; der Fimbriendurchmesser lag unter 7 nm. Für eine Beteiligung der Fimbrien an der Zellbindung an Sephadex sprechen folgende Ergebnisse:

a) Eine mechanische Entfernung der Fimbrien führte zu einem Verlust der Bindeeigenschaften der Zellen.

b) Zellen, die mit proteinschädigenden Agenzien, z.B. Proteinase K und Harnstoff, oder Hitze behandelt worden waren, verloren ebenfalls ihre Bindeeigenschaften.

Durch Behandlung von S. marcescens HY mit Nitrosoguanidin (NG) wurden zwei bindedefekte Mutanten isoliert, die unter verschiedenen Gesichtspunkten physiologisch charakterisiert wurden. Hinsichtlich ihrer Fimbriation waren elektronenoptisch keine Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtyp feststellbar. Fimbrien des Wildtyps und der Mutante K28 wurden isoliert und partiell gereinigt. Ihr Einsatz im Hemmtest ergab, daß die Fimbrien der Mutante bei einer Konzentration von 34 µg/ml eine 45 %ige Hemmung der Zellbindung verursachten, während die Fimbrien des Wildtyps bei der gleichen Konzentration die Zellbindung zu 100 % hemmten.

Substrat-Spezifität der Zellbindung

Die Zellbindung von S. marcescens HY an Polyglucane ist ein substratspezifischer Vorgang, denn eine deutliche Zellbindung erfolgte ausschließlich an Trägersubstanzen, die aus Polyglucanen bestanden, wie z.B. Stärkekörner, Cellulose und Sephadex. Die Einführung chemischer Gruppen, darunter neutrale, kationische und anionische, in die Bindesubstrate (Sephadex, Stärkekörner) verursachte eine erhebliche Verminderung ihrer Bindekapazität. Die möglichen Ursachen für diese Veränderung sind in der Diskussion behandelt worden. Die verwendeten modifizierten Trägersubstanzen wiesen einen niedrigen Substitutionsgrad auf. Daher ist es unwahrscheinlich, daß die Hydroxylgruppen der Polyglucane allein für die Zellbindung an Sephadex verantwortlich sind. Der niedrige Gehalt an Carboxylgruppen im Sephadex (Angaben des Herstellers Pharmacia) kann die Zellbindung an dieses partikuläre Polyglucan ebenfalls nicht erklären, unter anderem deshalb, weil höhere pH-Werte und Ionenstärken keine bemerkbaren Auswirkungen auf die Zellbindung hatten. Es wird vermutet, daß eine definierte, durch Interaktion mehrerer Dextranketten entstandene Tertiärstruktur auf der Sephadexoberfläche als Bindestelle dient.

Bindungstyp

Die Zellbindung an Sephadex beruht nicht auf einer kovalenten Bindung, da bereits gebundene Zellen durch verschiedene Agenzien (vgl. Tween, denaturiertes Pepsin) freigesetzt werden konnten. Aufgrund der Eluierbarkeit gebundener Zellen durch Tween 80 wird vermutet, daß für die Zellbindung im wesentlichen hydrophobe Wechselwirkungen verantwortlich sind. Für diese Annahme sprechen folgende Fakten:

a) Die Zellbindung an Sephadex weist gegenüber nohen pH-Werten, Ionenstärken und EDTA-Konzentrationen eine relativ niedrige Empfindlichkeit auf.
b) Die Fimbrien der Zellen von S. marcescens HY scheinen miteinander zu interagieren. Durch Ammoniumsulfat ausgefällte Fimbrien sammeln sich in der Luft-Wasser Interphase. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß die Fim-

brien von S. marcescens HY, wie auch die von anderen Autoren bisher untersuchten Fimbrien verschiedener Bakterienspezies, einen ausgeprägten hydrophoben Charakter besitzen.

LITERATURVERZEICHNIS

01) Appelbaum, B., Golub, E., Holt, S.C. and Rosan, B.: In vitro studies of dental plaque formation: Adsorption of oral Streptococci to hydroxyapatite. Infect. Immun. 25 (1979), S. 717-728.

02) Ash, S.G.: Adhesion of microorganisms in fermentation processes. In Ellwood, D.C., Melling, J. and Rutter, P. (eds.): Adhesion of microorganisms to surfaces. Academic Press, London (1979), S. 57-86.

03) Bigelow, C.C.: On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. J. Theoret. Biol. 16 (1967), S. 187-211.

04) Bohlool, B.B. and Schmidt, E.L.: Lectins: A possible basis for specifity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. Science 185 (1974), S. 269-271.

05) Boldt, D.H., Speckart, S.F., Richards, R.L. and Alving, R.C.: Interactions of plant lectins with glycolipids in liposomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 (1977), S. 208-214.

06) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254.

07) Brdčka, R.: Grundlagen der physikalischen Chemie. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1970), 9. Auflage, S. 543-546.

08) Brooker, B.E.: Electron microscopy of the dextrans produced by lactic acid bacteria. In Berkeley, C.W., Gooday, G.W. and Ellwood, D.C. (eds.): Microbial polysaccharides and polysaccharases. Academic Press, London, New York, San Francisco (1979), S. 85-115.

09) Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (eds.): Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore (1974), 8. Auflage, S. 1268-1270.

10) Charney, J. and Tomarelli, R.M.: A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J. Biol. Chem. 171 (1947), S. 501-505.

11) Cheng, K.J., Irvin, R.T. and Costerton, J.W.: Autochthonous and pathogenic colonization of animal tissues by bacteria. Can. J. Microbiol. 27 (1981), S. 461-489.

12) Clayton, E. and Graevenitz, A. von: Nonpigmented Serratia marcescens. JAMA 197 (1966), S. 1059-1064.

13) Comper, W.D. and Laurent, T.C.: An estimate of the enthalpic contribution to the interaction between dextran and albumin. Biochem. J. 175 (1978), S. 703-708.

14) Corpe, W.A.: An acidic polysaccharide produced by a primary film-forming marine bacterium. Dev. Ind. Microbiol. 11 (1970), S. 402-412.

15) Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, K.J.: How bacteria stick. Sci. Am. 238 (1978), S. 86-95.

16) Dazzo, F.B. and Hubbell, D.H.: Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specifity in the Rhizobium-clover association. Appl. Environ. Microbiol. 30 (1975), S. 1017-1033.

17) Dazzo, F.B., Napoli, C.A. and Hubbell, D.H.: Adsorption of bacteria to roots as related to host-specifity in the Rhizobium-clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 32 (1976), S. 168-171.

18) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 28 (1956), S. 350-356.

19) Dudman, W.F.: The role of surface polysaccharides in natural environments. In Sutherland, I.W. (ed.): Surface carbohydrates of the procaryotic cell. Academic Press, London, New York, San Francisco (1977), S. 357-414.

20) Duguid, J.P. and Old, D.C.: Adhesive properties of Enterobacteria. In Beachey, E.H. (ed.): Bacterial adherence. Chapman & Hall, London (1980), S. 185-218.

21) Eaves, G.N. and Jeffries, C.D.: Isolation and properties of an exocellular nuclease of Serratia marcescens. J. Bacteriol. 106 (1973), S. 273-278.

22) Edwards, R. and Rutter, P.R.: The adsorption of bovine serum albumin and dextran D250 at the solid-liquid interface. J. Colloid Interface Sci. 78 (1980), S. 304-311.

23) Emmerling, N.W. and Pfannenmüller, B.: Preparation of oligosaccharides, aldonolactons and N-(2-aminoethyl) aldonamides. Carbohydr. Res. 86 (1980), S. 321-324.

24) Entlicher, G., Kostíř, J.K. and Yocourek, J.: Studies on phytohemagglutinins. VIII:Isoelectric point and multiplicity of purified concanavalin A. Biochim. Biophys. Acta 236 (1971), S. 795-797.

25) Eshdat, Y., Ofek, I., Yashouv-Gan, Y., Sharon, N. and Mirelman, D.: Isolation of a mannose-specific lectin from Escherichia coli and its role in the adherence of the bacteria to epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85 (1978), S. 1551-1559.

26) Evans, D.G. and Evans, D.J.: New surface associated heat labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups O6 and O8. Infect. Immun. 21 (1978), S. 638-647.

27) Evans, D.G., Evans, D.J., Tjoa, W.S. and DuPont, H.L.: Detection and characterization of colonization factor of Escherichia coli isolated from adults with diarrhea. Infect. Immun. 19 (1978), S. 727-736.

28) Evans, D.G., Silver, R.P., Evans, D.J., Chase, D.G. and Gorbach, S.L.: Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in Escherichia coli enterotoxigenic for humans. Infect. Immun. 12 (1975), S. 656-667.

29) Fletcher, M.: The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene. J. Gen. Microbiol. 94 (1976), S. 400-404.

30) Fletcher, M.: The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. Can. J. Microbiol. 23 (1977), S. 1-6.

31) Fletcher, M.: Adherence of marine micro-organisms to smooth surfaces. In Beachey, E.H. (ed.): Bacterial adherence. Chapman & Hall, London (1980), S. 345-374.

32) Fletcher, M. and Floodgate, G.D.: An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. J. Gen. Microbiol. 74 (1973), S. 325-334.

33) Frisch-Niggemeyer, W. and Reddi, K.K.: Studies on ribonuclease in tobacco leaves. Biochim. Biophys. Acta 26 (1957), S. 40-46.

34) Frost, L.S. and Paranchych, W.: Composition and molecular weight of pili purified from Pseudomonas aeruginosa K. J. Bacteriol. 131 (1977), S. 259-269.

35) Gibbons, R.J. and Houte, J. van: Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann. Rev. Microbiol. 29 (1975), S. 19-44.

36) Gilboa-Garber, N.: Inhibition of broad spectrum hemagglutinin from Pseudomonas aeruginosa by D-galactose and its derivatives. FEBS Letters 20 (1972), S. 242-244.

37) Gilboa-Garber, N., Mizrahi, L. and Garber, N.: Mannose-binding hemagglutinins in extracts of Pseudomonas aeruginosa. Can. J. Biochem. 55 (1977), S. 975-981.

38) Goldstein, I.J. and Hayes, C.E.: The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. In Tipson, R.S. and Horton, D. (eds.): Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35 (1978), S. 127-340.

39) Goldstein, I.J., Hollerman, C.E. and Smith, E.E.: Protein-carbohydrate interaction. II: Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides. Biochemistry 4 (1965), S. 876-883.

40) Görlich, B.: Dextran und Dextranderivate. Sonderdruck aus Mitteilungen der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft und der Pharmazeutischen Gesellschaft der DDR 7, Verlag Chemie, Weinheim (1969), S. 149-167.

41) Gould, K., Ramirez-Ronda, C.H., Holmes, R.K. and Sandford, J.P.: Adherence of bacteria to heart valves in vitro. J. Clin. Invest. 56 (1975), S. 1364-1370.

42) Graefe, G.: Modifizierte Stärken als Bestandteile von Lebensmitteln. Stärke 5 (1974), S. 145-180.

43) Graevenitz, A. von: The role of opportunistic bacteria in human disease. Ann. Rev. Microbiol. 31 (1977), S. 447-471.

44) Grimont, A.D.P. and Grimont, F.: The genus Serretia. Ann. Rev. Microbiol. 32 (1978), S. 221-248.

45) Grimont, A.D.P., Grimont, F. and Dulong de Rosnay, H.L.: Taxonomy of the genus Serratia. J. Gen. Microbiol. 98 (1977), S. 39-66.

46) Hamblin, J. and Kent, S.P.: Possible role of phytohaemogglutinin in Phaseolus vulgaris L. Nature 245 (1973), S. 28-30.

47) Hayat, M.A.: Principles and techniques of electron-microscopy. Biological applications, Vol. 1. Van Nostrand Reinhold Co., New York, Toronto, London (1970), S. 340-341.

48) Helenius, A. and Simons, K.: Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta 415 (1975), S. 29-79.

49) Hermansson, M., Kjelleberg, S. and Norkrans, B.: Interaction of pigmented wildtype and pigmentless mutant of Serratia marcescens with lipid surface films. FEMS Microbiology Letters 6 (1979), S. 129-132.

50) Hohmann, A. and Wilson, M.R.: Adherence of enteropathogenic Escherichia coli to intestinal epithelium in vivo. Infect. Immun. 12 (1975), S. 866-880.

51) Jones, G.W. and Rutter, J.M.: Role of K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhoea caused by Escherichia coli in piglets. Infect. Immun. 6 (1972), S. 918-927.

52) Karkhanis, Y.D., Zeltner, J.Y., Jackson, J.J. and Carlo, D.J.: A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctanate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. Anal. Biochem. 85 (1978), S. 595-601.

53) Kelstrup, J. and Funder-Nielsen, T.D.: Molecular interactions between the extracellular polysaccharides of Streptococcus mutans. Arch. Oral Biol. 17 (1972), S. 1659-1670.

54) Kittsley, S.L.: Physical Chemistry. Barnes & Noble Books, New York, San Francisco, London (1977), 3. Auflage, S. 212-216.

55) Konieczyn-Janda, G. und Stute, R.: Differential-Raster-Kalorimetrie-Untersuchungen an Stärke-Lipid-Komplexen. In Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung e.V.: 32. Stärke-Tagung in Detmold vom 28. - 30. April 1981. Granum Verlag, Detmold (1981).

56) Laurent, T.C.: The interaction between polysaccharides and other macromolecules. The solubility of proteins in the presence of dextran. Biochem. J. 89 (1963), S. 253-257.

57) Lehrfeld, J.: Purification of commercial maltose and improved detection of oligosaccharides on paper chromatograms. Carbohyd. Res. 19 (1971), S. 400-401.

58) Leive, L., Shovlin, V.K. and Mergenhagen, E.S.: Physical, chemical, and immunological properties of lipopolysaccharides released from Escherichia coli by ethylenediamine tetraacetate. J. Biol. Chem. 243 (1968), S. 6384-6391.

59) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951), S. 265-275.

60) Marshall, K.C. and Bitton, G.: Microbial adhesion in perspective. In Bitton, G. and Marshall, K.C. (eds.): Adsorption of microorganisms to surfaces. Wiley & Sons, New York, Toronto (1980), S. 1-5.

61) Marshall, K.C., Stout, R. and Mitchell, R.: Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. J. Gen. Microbiol. 68 (1971), S. 337-348.

62) McKenzie, H.A. and Dawson, R.M.C.: pH, buffers, and physiological media. In Dawson, R.M.C., Elliot, D.C., Elliot, E.H. and Jones, K.M. (eds.): Data for biochemical research. Oxford University Press (1969), S. 476-626.

63) McMichael, J.C. and Ou, J.T.: Structure of common pili from Escherichia coli. J. Bacteriol. 138 (1979), S. 969-975.

64) Meadows, P.S.: The attachment of bacteria to solid surfaces. Arch. Mikrobiol. 75 (1971), S. 374-381.

65) Melvaer, K.L., Helgeland, K. and Rölla, G.: A charged component in purified polysaccharide preparations from Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis. Arch. Oral Biol. 19 (1974), S. 589-595.

66) Minato, H. and Suto, T.: Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. J. Gen. Appl. Microbiol. 25 (1979), S. 71-93.

67) Nurok, D. and Zlatkis, A.: The separation of maltooligosaccharides by high performance thin layer chromatography using multiple developments. Carbohydr. Res. 81 (1980), S. 167-172.

68) Ofek, I. and Beachey, E.H.: General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. In Beachey, E.H. (ed.): Bacterial adherence. Chapman & Hall, London (1980), S. 1-30.

69) Ogston, A.G. and Silpanata, P.: The thermodynamics of interaction between sephadex and penetrating solutes. Biochem. J. 116 (1970), S. 171-175.

70) Ørskov, I. and Ørskov, F.: Episome carried surface antigen K88 of Escherichia coli. J. Bacteriol. 91 (1966), S. 69-75.

71) Ørskov, I., Ørskov, F., Smith, H.W. and Sojka, W.J.: Establishment of K99, thermolabile, Escherichia coli K antigen, previously called "Kco" possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B., 83 (1975), S. 31-36.

72) Portales, M.L. und Winkler, U.: Spezifische Bindung von Serratia marcescens HY an partikuläre und gelöste Polyglucane. In Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie: 37. Tagung in Berlin vom 1. - 3. Okt. 1979.

73) Pearce, A.W. and Buchanan, T.M.: Structure and cell membrane-binding properties of bacterial fimbriae. In Beachey, E.H. (ed.): Bacterial adherence. Chapman & Hall, London (1980), S. 389-344.

74) Rees, D.A.: Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. In Tipson, R.S. and Horton, D. (eds.): Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 24 (1969), S. 267-332.

75) Rorem, E.S.: Uptake of rubidium and phosphat ions by polysaccharide-producing bacteria. J. Bacteriol. 70 (1955), S. 691-701.

76) Roth, S.: A molecular model for cell interactions. The Quarterly Review of Biology 48 (1973), S. 541-563.

77) Ruthmann, A.: Methoden der Zellforschung. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart (1966), S. 215-217.

78) Rutter, J.M., Jones, G.W., Brown, G.T.H., Burrows, M.R. and Luther, P.D.: Antibacterial activity in colostrum and milk associated with protection of piglets against enteric disease caused by K88-positive Escherichia coli. Infect. Immun. 13 (1976), S. 667-676.

79) Sänger, W.: Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. Angew. Chem. Int. 19 (1980), S. 344-362.

80) Sattlerwhite, T.K., DuPont, H.L., Evans, D.G. and Evans, D.J.: Role of Escherichia coli colonization factor antigen in acute diarrhoea. Lancet 2 (1978), S. 181-184.

81) Savage, D.C. and Blumershine, R.V.H.: Surface-surface associations in microbial communities populating epithelial habitats in the murine gastrointestinal ecosystem: scanning electron microscopy. Infect. Immun. 10 (1974), S. 240-250.

82) Shigeyuki, H. and Slade, D.H.: Mechanisms of adherence of Streptococcus mutans to smooth surfaces in vitro. In Beachey, E.H. (ed.): Bacterial adherence. Chapman & Hall, London (1980), S. 105-135.

83) Smith, H.W. and Linggood, M.A.: Observations on the pathogenic properties of the K88, HLY and ENT plasmids of Escherichia coli with particular reference to porcine diarrhoea. J. Med. Microbiol. 4 (1971), S. 467-485.

84) Smith, H.W. and Linggood, M.A.: Further observations on Escherichia coli enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains; the transmissible nature of these enterotoxins and of a K-antigen possessed by calf and lamb strains. J. Med. Microbiol. 5 (1972), S. 243-250.

85) Spiro, R.G.: Analysis of sugars found in glycoproteins. In Neufeld, E.F. and Ginsburg, V. (eds.): Methods in enzymology, Vol. 8. Academic Press, New York (1966), S. 3-26.

86) Tanzer, J.M. and Freedman, M.L.: Genetic alterations of Streptococcus mutans virulence. Adv. exp. Med. Biol. 107 (1978), S. 661-672.

87) Thöner, M.: Untersuchungen über die extrazelluläre Lipase von Serratia marcescens. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum (1973).

88) Walles, E.W.: Role of flocculant molecular weight in the coagulation of suspensions. J. Colloid Interface Sci. 27 (1968), S. 797-803.

89) Wandersman, C., Swartz, M. and Ferenci, T.: Escherichia coli mutants impaired in maltodextrin transport. J. Bacteriol. 140 (1979), S. 1-13.

90) Winkler, U., Heller, K.B. und Folle, B.: Pleiotropic consequences of mutations towards antibiotic-hypersensitivity in Serratia marcescens. Arch. Microbiol. 116 (1978), S. 259-268.

91) Winkler, U., Rüger, W., Wackernagel, W.: Bakterien-, Phagen- und Molekulargenetik. Praktikum der Genetik, Band 1. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1972).

92) Winkler, U. and Stuckmann, M.: Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. J. Bacteriol. 138 (1979), S. 663-670.

93) Wolpert, J.S. and Albersheim, P.: Host-symbiont interactions. I: The lectines of legumes interact with the O-antigen-containing lipopolysaccharides of their symbiont rhizobia. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70 (1976), S. 729-739.

94) Wurzburg, O.B.: Acetylation. In Whistler, R.L., Smith, R.J. and Miller, J.N. (eds.): Methods in carbohydrate chemistry, Vol. IV: Starch. Academic Press, New York, London (1964), S. 286-288.

95) Zo Bell, C.E.: The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol. 46 (1943), S. 39-56.

LEBENSLAUF

10. Nov. 1953	geboren als Tochter von Antonio Portales und Maria Luisa R. de Portales in Acatlán, Puebla, Mexiko.
1958 - 1963	Grundschule "Escuela Emiliano Zapata", Mexiko-Stadt.
1964 - 1966	Mittelstufe "Escuela Secundaria Anexa a la Normal Superior", Mexiko-Stadt.
1967 - 1968	Oberstufe "Escuela Vocacional No. 6 de Ciencias Medico-Biologicas", Mexiko-Stadt.
5. März 1969	Erlangung der Hochschulreife.
1969	Aufnahme des Studiums an der "Escuela Nacional de Ciencias Biologicas del Instituto Politecnico Nacional", Mexiko-Stadt. Fachrichtung: Quimico Farmaceutico Industrial (Industrie-Chemiker-Pharmazeut).
Jan. 1973	Beginn der Diplom-Arbeit. Titel: Biochemische Untersuchungen isolierter Leberzellen.
15. Nov. 1973	Diplom-Prüfung.
März - Sept. 1974	Vertiefungsstudium im "Instituto Superiore di Sanitá", Rom, Italien.
Okt. 1976 - März 1977	Deutschkurse im Goethe-Institut, Iserlohn.
April - Okt. 1977	Vertiefungsstudium am Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen an der Ruhr-Universität Bochum.
Nov. 1977	Anerkennung als Doktorand an der Abteilung für Biologie an der Ruhr-Universität Bochum.

DER DRUCKER - Buscheystraße 138 - 4630 Bochum - Tel. (02 34) 70 41 16